

ФАРМАКОЛОГИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕЙРОГЛУТАМА В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

И. Н. Тюренков¹, Е. В. Волотова¹, Д. В. Куркин¹, Д. А. Бакулин¹,
И. О. Логвинов², Т. А. Антипова²

In vitro и *in vivo* изучено нейропротекторное действие нового производного глутаминовой кислоты — нейроглутама. Показано, что исследуемое соединение обладает протективным действием на модели 6-ОН-дофаминовой нейротоксичности, основным молекулярным патогенетическим звеном которой является свободно-радикальное окисление. При фокальной ишемии головного мозга отмечали выраженное повышение ТБК-активных продуктов и снижение активности супероксиддисмутазы – фермента антиоксидантной защиты. Нейроглутам при профилактическом введении 2-летним крысам с фокальной церебральной ишемией снижал концентрацию ТБК-активных продуктов в плазме крови на 34,5 % ($p < 0,05$), повышал активность супероксиддисмутазы и увеличивал время гемолиза эритроцитов, индуцированного соляной кислотой в среднем на 40 % ($p < 0,05$).

Ключевые слова: нейроглутам; крысы; церебральная ишемия; свободно-радикальное окисление.

ВВЕДЕНИЕ

В развитии нейродегенеративных патологий значительная роль отводится процессам перекисного окисления липидов (ПОЛ). Липиды входят в состав всех клеточных мембран, обеспечивают постоянство внутренней среды клетки, её заряда, передачу сигналов и другие процессы. При активации ПОЛ, т.е. при смещении про- и антиоксидантного равновесия, происходит повреждение мембран клеток, что нарушает её структуру и нормальное функционирование, вплоть до её гибели. Поэтому в комплексном лечении нейродегенеративных заболеваний особое место занимают препараты с антиоксидантными свойствами. В настоящее время по химическим свойствам антиоксиданты подразделяют на 2 группы: “ловушки радикалов”, непосредственно взаимодействующие со свободными радикалами и “скавенжеры” (уборщики), разлагающие продукты свободно-радикального окисления (СРО) с их последующей инактивацией и утилизацией. К последним относится глутаминовая кислота. Поэтому, учитывая ранее полученные нами результаты о нейропротекторном действии нейроглутама в условиях церебральной ишемии [1, 2], его химическую структуру (нейроглутам является бета-фенильным производным глутаминовой кислоты), а также роль свободно-радикального окисления в развитии нейродегенеративных процессов, мы посчитали целесообразным изучить

нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления *in vitro* и *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование *in vitro*

Для исследования протекторных свойств нейроглутама *in vitro* была выбрана модель окислительного стресса 6-ОН-дофаминового (6-ОНДА) повреждения клеток. 6-гидроксидофамин является окислительным нейротоксином, который используется для моделирования повреждения дофаминовых нейронов, имеющее место при болезни Паркинсона. Спонтанное автоокисление 6-ОНДА приводит к образованию перекиси водорода, супероксид- и гидроксильного радикалов [10]. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что внутриклеточный оксидативный стресс вовлечен в нейротоксичность 6-ОНДА [8 – 10].

Для эксперимента клетки нейробластомы человека SH-SY5Y рассеивали в 96-луночные планшеты с плотностью 15 тыс. клеток на лунку в среде ДМЕМ с добавлением 15 % сыворотки FBS. 6-ОНДА добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 100 мкМ [14]. Нейроглутам вносили до конечных концентраций 10^{-5} – 10^{-8} М за 24 ч до повреждения 6-ОНДА или сразу после его деструктивного воздействия. Жизнеспособность клеток определяли с использованием МТТ-теста [13] через 24 ч после внесения 6-ОНДА.

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов.

² ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

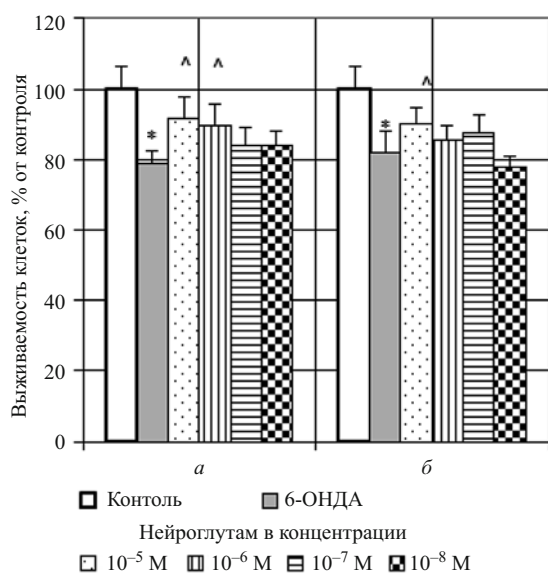


Рис. 1. Влияние различных концентраций нейроглутама на выживаемость клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y на модели 6-ОН-дофаминовой нейротоксичности.

Обозначения: а) внесение нейроглутама за 24 ч до 6-ОН-дофамина, б) внесение нейроглутама после 6-ОН-дофамина; достоверность отличий: * $p \leq 0,05$ — от контроля; ^ $p \leq 0,05$ — от 6-ОН-дофамина. Ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Данна.

Исследование *in vivo*

Поскольку нейродегенеративные заболевания чаще развиваются у лиц старшей возрастной группы с сопутствующими нарушениями мозгового кровообращения, исследование выполнено на 24 старых крысах-самцах в возрасте 24 мес массой 350 – 400 г (питомник лабораторных животных РАН “Рапполово”). Животных отбирали с учетом требований к формированию репрезентативных выборок по принципу рандомизации. Крысы были разделены на 3 группы (по 8 особей в каждой): 1-я группа — ложнооперированные животные (“ЛО”), 2-я группа (“контроль-ишемия”) — животные, которым моделировали фокальную ишемию путем необратимой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) [6], 3-я группа (“нейроглютам + ишемия”) — животные, у которых воспроизводили фокальную ишемию головного мозга и которые получали нейроглютам в дозе, оказывающей более выраженное нейропротекторное действие — 26 мг/кг [5]. Исследуемое соединение вводили внутривенно однократно за 30 мин до моделирования ОСМА. Животные ложнооперированной и группы “контроль — ишемия” получали физиологический раствор в режиме, аналогичном с группой “нейроглютам + ишемия”.

О нейропротекторном действии препарата судили по выраженности когнитивного дефицита у животных с фокальной ишемией головного мозга. Оценку когнитивных функций животных проводили в стандартных психоневрологических тестах: “Условная реакция пассивного избегания” (УРПИ), “Тест экстраполяционно-го избегания” (ТЭИ). “Обучение” и “Воспроизведе-

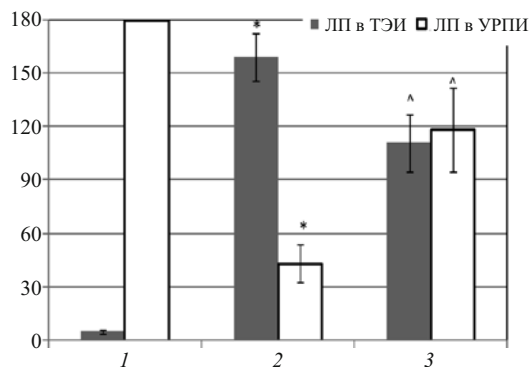


Рис. 2. Время решения экстраполяционной задачи в тесте экстраполяционного избегания и латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ крыс с фокальной ишемией головного мозга ($c, M \pm m$).

По оси абсцисс: 1 — “ЛО”, 2 — “контроль — ишемия”, 3 — “нейроглютам + ишемия”; ЛП — латентный период (с); * — различия достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с “ЛО” крысами ($p < 0,05$); ^ — различия достоверны по критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с группой “контроль — ишемия” ($p < 0,05$).

ние 1” в данных тестах проводили с интервалом 24 ч до начала моделирования фокальной ишемии, “Воспроизведение 2” выполняли на 7-й день после ОСМА. После чего у крыс под наркозом производили забор крови для исследования уровня продуктов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы. Интенсивность ПОЛ исследовали по содержанию ТБК-активных продуктов (ТБКАП), основным из которых является малоновый диальдегид [3]. Концентрацию ТБКАП определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). Для характеристики антиоксидантного статуса спектрофотометрически измеряли активность ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы при длине волны 406 и 410 нм соответственно [3, 4]. Резистентность мембраны эритроцитов определяли методом кислотных эритрограмм [7].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel и BioStat 2008 5.2.5.0. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая, m — ошибка среднего; статистически значимыми признавали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование *in vitro*

При исследовании протекторного действия нейроглутама на модели 6-ОНДА нейротоксичности показано, что при внесении препарата за 24 ч до повреждения эффективными были концентрации 10⁻⁵ – 10⁻⁶ М (рис. 1, а).

В схеме эксперимента, когда нейроглютам вносили после 6-ОНДА, препарат защищал клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y только в высокой концентрации 10⁻⁵ М (рис. 2, б).

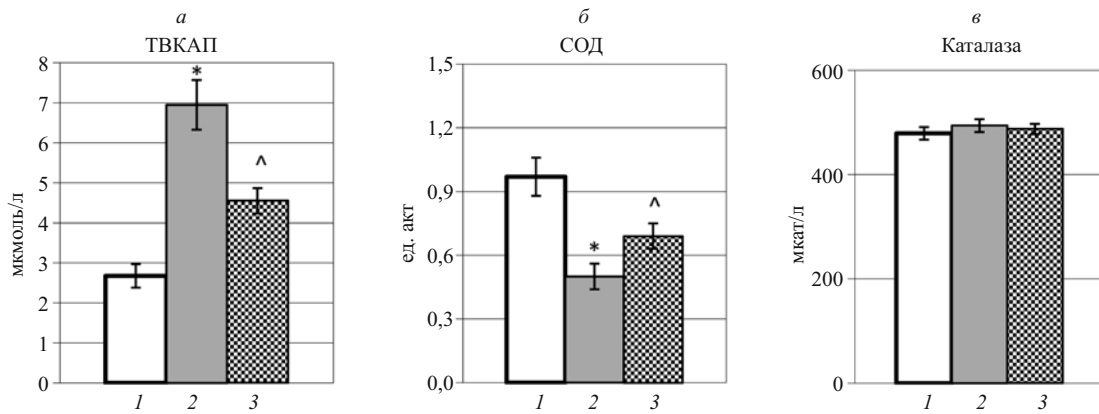


Рис. 3. Влияние нейроглутама на концентрацию в плазме крови: а) ТБКА-активных продуктов, мкмоль/л, б) активность супероксиддисмутазы, ед. акт., и в) каталазы, мкат/л, у крыс при экспериментальной церебральной ишемии головного мозга ($M \pm m$).

По оси абсцисс: 1 — "ЛО", 2 — "контроль — ишемия", 3 — "нейроглютам + ишемия", * $p < 0,05$ — достоверно по сравнению с группой "контроль — ишемия"; ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейлса.

Таким образом, установлено, что нейроглютам обладает протекторным действием на модели 6-ОНДА нейротоксичности, сопровождающейся по литературным данным увеличением интенсивности СРО [8–10]. Поскольку это действие наиболее выражено при внесении препарата в среду инкубации за 24 ч до повреждения, мы посчитали целесообразным продолжить дальнейшее изучение нейропротекторного действия нейроглутама в условиях активации СРО при его профилактическом введении старым крысам с фокальной ишемией головного мозга.

Исследование *in vivo*

Окклюзия средней мозговой артерии у экспериментальных животных приводила к развитию явлений ретроградной амнезии, которые проявлялись в уменьшении латентного периода захода в темный отсек, увеличению количества заходов в него в тесте УРПИ, а также увеличению латентного периода решения экстраполяционной задачи и снижению числа животных, решивших ее в тесте ТЭИ, по сравнению с группой ложнооперированных животных. У животных, профилактически получавших нейроглютам, показатели когнитивной функции были выше, чем у животных группы "контроль — ишемия" (рис. 2).

Ишемическое повреждение головного мозга старых крыс приводило к активации процессов ПОЛ, что выражалось в накоплении ТБКАП в плазме крови по сравнению с группой ложнооперированных животных (рис. 3). Так на фоне ишемии головного мозга на 7-е сут у крыс группы "контроль — ишемия" концентрация ТБКАП была в 2,5 раза выше, чем у крыс группы ложнооперированных животных. Профилактическое применение нейроглутама нивелировало проявления окислительного стресса у старых крыс, перенесших фокальную ишемию, предупреждая накопления ТБКАП (на 34,5 %) (рис. 3, а).

Интенсификация процессов ПОЛ у крыс группы "контроль — ишемия", очевидно, была обусловлена

снижением активности ферментов антиоксидантной системы (рис. 3). Так активность СОД в плазме крови данной группы животных с окклюзией средней мозговой артерии достоверно снижалась по сравнению с ложнооперированными крысами в 1,9 раза (при $p < 0,05$) (рис. 3, б). Профилактическое введение крысам нейроглутама перед моделированием фокальной ишемии приводило к повышению активности СОД в плазме крови по сравнению с группой "контроль — ишемия" в 1,4 раза (рис. 3, б). Активность каталазы у животных всех групп достоверно не отличалась между собой (рис. 3, в).

При церебральной ишемии наблюдается переход окисления глюкозы на анаэробный путь. В таких условиях интенсификация процессов ПОЛ и метаболический ацидоз могут вызывать повреждение клеточных мембран. Наиболее чувствительными в этом отношении признаны эритроциты, поэтому оценка продолжительности гемолиза эритроцитов может косвенно говорить об интенсивности ПОЛ и степени повреждения мозговой ткани. Продолжительность гемолиза эритроцитов в группе животных "контроль — ишемия" составила в среднем $4,5 \pm 0,35$ мин, что практически в 1,5 раза ниже, чем у ложнооперированных животных. Профилактическое применение нейроглутама перед ОСМА увеличивало продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов до $6,3 \pm 0,25$ мин, что значительно выше показателя контрольной группы ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о возможном положительном мембранопротекторном влиянии исследуемого соединения, которое, в свою очередь, вероятно, обусловлено его возможной антиоксидантной активностью и снижением негативных эффектов метаболического ацидоза.

Таким образом, установлено, что нейроглютам обладает нейропротекторным действием при активации СРО в условиях *in vitro* и *in vivo*

ВЫВОДЫ

1. Нейроглутам обладает цитопротекторным действием на модели окислительного стресса, вызванного 6-ОНДА, наиболее выражено в профилактическом режиме.

2. При фокальной ишемии у старых крыс нейроглутам уменьшает выраженность когнитивного дефицита, увеличивает продолжительность кислотногемолитического теста и снижает интенсивность процессов ПОЛ на фоне повышения антиоксидантной защиты, улучшения функционального состояния мембран эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Волотова, Н. В. Мазина, Д. В. Куркин, И. Н. Тюренок, *Вестник Волгоград. гос. мед. универ.*, **45**(1), 40 – 42 (2013).
2. Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Н. В. Мазина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(6), 11 – 13 (2013).
3. М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, Н. О. Майорова и др., *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
4. В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева, *Вопр. мед. химии*, **36**(2), 88 – 91 (1990).
5. В. И. Петров, И. Н. Тюренок, В. В. Багметова и др., Патент РФ № 242983RU, *Бюл. изобрет.*, № 27 (2011).
6. А. В. Топчян, Р. С. Мирзоян, М. Г. Баласанян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **59**(5), 62 – 64 (1996).
7. Г. А. Чернецкий, *Способы определения резистентности эритроцитов*, Наука-Белорус, Минск (2002).
8. М. Asanuma, Н. Hirata, J. L. Cadet, *Neuroscience*, **85**(3), 907 – 917 (1998).
9. M. Barkats, S. Millecamps, A. Bilang-Bleuel, J. Mallet, *J. Neurochem.*, **82**(1), 101 – 109 (2002).
10. J. Callio, T. D. Oury, C. T. Chu, *J. Biol. Chem.*, **280**(18), 18536 – 1842 (2005).
11. G. Cohen, R. E. Heikkila, *J. Biol. Chem.*, **249**(8), 2447 – 2452 (1974).
12. A. Guerrero, J. A. González-Correa, M. M. Arrebola, *Neurosci. Lett.*, **358**(3), 153 – 156 (2004).
13. G. R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E. L. Ezell, et al., *Brain Res.*, **592**(1), 239 – 248 (1992).
14. K. Riveles, L. Z. Huang, M. Quik, *Neurotoxicology*, **29**(3), 421 – 427 (2008).

Поступила 29.07.14

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF NEIROGLUTAM UNDER CONDITIONS OF ACTIVATED FREE RADICAL OXIDATION

I. N. Tyurenkov¹, E. V. Volotova¹, D. V. Kurkin¹, D. A. Bakulin¹, I. O. Logvinov², and T. A. Antipova²

¹ Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

² Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

The neuroprotective properties of the novel glutamic acid derivative neuroglutam have been studied *in vitro* and *in vivo*. Neuroglutam demonstrated the protective action on 6-OH-dopamine neurotoxicity model <MI>in vitro, where free radical oxidation is a basic part of pathogenesis. In control rats, focal brain ischemia caused significant increase in thiobarbituric acid reactive species (TBARS) level and decrease in superoxide dismutase (SOD) enzyme activity. In two-year-old rats, preventive administration of the neuroglutam caused a significant reduction in the TBARS plasma concentration (34.5%, $p < 0.05$), increased SOD activity, and increased the time of acid-induced hemolysis of erythrocytes (40%, $p < 0.05$).

Keywords: neuroglutam, rats, brain ischemia, free-radical oxidation