Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro*

А.В. ШУЛЬКИН

Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the neuronal excitotoxicity *in vitro*

A.V. SHCHULKIN

Кафедра фармакологии с курсом фармакотерапии факультета последипломного образования Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова

Цель исследования — изучение влияния мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности *in vitro*. Установлено, что мексидол *in vitro* подавляет развитие глутамат-индуцируемой нейротоксичности, аскорбатзависимого (неферментативного) и $НАДФН_2$-зависимого (ферментативного) железо-индуцируемого перекисного окисления липидов, в высоких концентрациях обладает способностью связывать супероксидный анион-радикал, значительно повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, снижает активность индуцибельной NO-синтазы и не влияет на активность глутатион-SH-трансферазы, каталазы и нейрональной NO-синтазы. Данные эффекты лежат в основе антиоксидантного и антигипоксического действия препарата.

Ключевые слова: *мексидол, глутамат-индуцируемая нейротоксичность, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-SH-трансфераза, индуцибельная и нейрональная NO-синтаза.*

Effect of mexidol on the development of the phenomenon of the excitotoxic syndrome *in vitro* has been studied. Mexidol inhibits *in vitro* the development of glutamate-induced neurotoxicity, ascorbate-dependent (non-enzymatic) and $NADPH_2$-dependent (enzymatic) iron-induced lipid peroxide oxidation, is able in high concentrations to bind superoxide anion-radical, significantly increases the activity of Se-dependent glutathione peroxidase, decreases the activity of induced NO-synthase and does not impact on the activity of glutathione-SH-transferase, catalase and neuronal NO-synthase. These effects underlie the antioxidant and antihypoxic action of the drug.

Key words: *mexidol, glutamate-induced neurotoxicity, lipid peroxide oxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-SH-transferase, induced and neuronal NO-synthase.*

В настоящее время ведущая роль в патогенезе большинства нервных и психических заболеваний отводится нарушению функционирования нейромедиаторных и нейромодуляторных систем, в частности выбросу возбуждающего медиатора — глутамата, лежащему в основе так называемой «смерти от перевозбуждения» или феномена эксайтотоксичности [2, 5].

Глутамат содержится в большинстве нейронов мозга. При гипоксии нервных клеток (возникающей при многих заболеваниях ЦНС) глутамат высвобождается из окончаний нейронов в межклеточное пространство. Его избыточное накопление активирует ионотропные NMDA- и AMPA-подтипы рецепторов, вызывая массивный приток ионов Ca^{2+} в цитоплазму постсинаптического нейрона. Кальций в свою очередь запускает ряд процессов: активацию дыхательной цепи митохондрий с увеличением утечки супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала; активацию $НАДФН_2$-оксидазы, в результате чего повышается содержание супероксидного анион-радикала; активацию NO-синтазы (NOS), что приводит к накоплению NO; активацию гемоксигеназы, которая переводит Fe^{3+} в Fe^{2+}. Все перечисленные процессы интенсифицируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), в ответ происходит активация антиоксидантной системы защиты клетки. При длительной гипоксии наблюдается ее истощение, что приводит к развитию окислительного стресса и гибели нервных клеток путем апоптоза или некроза в зависимости от степени их повреждения [2, 5, 10, 13].

Мексидол — 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат — синтетический антиоксидант, создание и внедрение в клиническую практику которого является несомненным достижением отечественной фармакоиндустрии. Препарат доказал свою эффективность в лечении ряда неврологических и психических заболеваний [12]. Однако некоторые аспекты механизма и локализации его действия, например нейронные, окончательно не изучены.

Цель настоящего исследования — изучение влияния мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности *in vitro*.

© А.В. Шулькин, 2012

Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2012;112:2:35

Тел.: +7 (4912) 76-0466

Материал и методы

В исследовании использовали 5% раствор мексидола («Фармасофт»).

Для изучения влияния мексидола на нейротоксичность глутамата у анестезированных нелинейных белых крыс-самцов извлекали из черепной коробки головной мозг и делали из него срезы толщиной 1 мм [7]. Из срезов или сразу готовили гомогенат (норма), или инкубировали их в течение 15 мин при температуре 37 °С в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl буфера («Serva»), 0,25 М сахарозного буфера при pH=7,4 («Химмед»), 1 мМ L-глутамата («Sigma») (контрольная серия) и разные концентрации мексидола (опытные серии). После инкубации этих срезов также готовили гомогенат. Для оценки выраженности повреждения нейронов определяли уровень вторичного продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА) — по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3].

Влияние мексидола на свободнорадикальное окисление, индуцируемое двухвалентным железом, изучали в двух метаболизирующих модельных системах (неферментативного — аскорбатзависимого и ферментативного — $НАДФН_2$-зависимого ПОЛ). В качестве субстрата ПОЛ использовали гомогенат мозга нелинейных белых крыс-самцов [6]. В состав первой модельной системы, неферментативного аскорбатзависимого ПОЛ, входили: 0,6 мл гомогената мозга крыс, 0,6 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH=7,4) («Химмед»), 0,4 мл 72 мкМ раствора соли Мора («Химмед»), 0,4 мл 4,8 мМ раствора аскорбиновой кислоты («Serva»), 0,4 мл раствора изучаемого вещества (опытная серия) или фосфатного буфера (контроль). Состав второй модельной системы, ферментативного $НАДФН_2$-зависимого ПОЛ, включал: 0,6 мл гомогената мозга крыс, 0,6 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH=7,4), 0,4 мл 72 мкМ раствора соли Мора, 0,4 мл 2,4 мМ раствора $НАДФН_2$ («Sigma»), 0,4 мл раствора изучаемого вещества (опытная серия) или фосфатного буфера (контроль) [6]. Данные модельные системы инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 30 мин при свободном доступе кислорода. Выраженность окислительного стресса также определяли по уровню МДА. Ингибирование ПОЛ мексидолом оценивали как отношение разности между приростом концентрации МДА в пробах, не содержащих изучаемый препарат (контроль), и пробах с ним (опытная серия) к приросту концентрации МДА в контрольных пробах: ингибирование ПОЛ (%)=(ΔЕк–ΔЕо)/ΔЕк×100%, где ΔЕк — прирост концентраций МДА в пробах, не содержащих препарат, в разные сроки инкубации, а ΔЕо — прирост концентраций МДА в пробах, содержащих препарат. Прирост концентраций МДА оценивали через 5 мин (Е5 мин — Е0 мин), через 15 мин (Е15 мин — Е5 мин) и через 30 мин (Е30 мин — Е15 мин) от начала инкубации.

Способность мексидола связывать супероксидный анион-радикал изучали в модельной системе, основанной на спонтанном окислении кверцетина [12]. Пусковой стадией в этом процессе является образование супероксидного анион-радикала, поэтому вещества, способные связывать активные формы кислорода, тормозят аутоокисление кверцетина. В состав реакционной смеси входили: 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH=7,8), 2,4 мл дистиллированной воды или раствора изучаемого вещества, 0,058 мл тетраметилэтилендиамина («Sigma»), 0,08 мМ ЭДТА («Химмед»). Реакцию начинали внесением в среду инкубации 0,1 мл 0,462 мМ раствора кверцетина («Sigma»). Об антисупероксидной активности судили по проценту ингибирования аутоокисления кверцетина (А%), рассчитанному по формуле: $А\% = (ОД_1 — ОД_2)/ОД_1 \times 100\%$, где $ОД_1$ — изменение оптической плотности пробы без препаратов, $ОД_2$ — изменение оптической плотности пробы в присутствии изучаемых препаратов.

Влияние мексидола на активность Cu, Zn-супероксиддисмутазы (СОД), Se-зависимой глутатионпероксидазы, 1-изофермента глутатион-SH-трансферазы, каталазы, нейрональной NO-синтазы (nNOS) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) изучали с использованием соответствующих ферментов («Roche)» в модельных системах, предназначенных для определения их активности: СОД — по торможению спонтанного окисления кверцетина [8]; Se-зависимой глутатионпероксидазы — по снижению концентрации $НАДФН_2$ в сопряженной системе $НАДФН_2$—глутатионредуктаза [9]; 1-изофермента глутатион-SH-трансферазы — по реакции образования конъюгата 1,2-дихлор-3-нитробензола с глутатионом [16]; каталазы — по уменьшению уровня пероксида водорода [1]; nNOS и iNOS — по уменьшению содержания $НАДФН_2$ [11]. Воздействие мексидола на активность ферментов рассчитывали по формуле: $А\% = (ОД_2 — ОД_1)/ОД_1 \times 100\%$, где $ОД_1$ — активность фермента без мексидола, $ОД_2$ — активность фермента в присутствии мексидола.

В качестве препаратов сравнения при изучении антисупероксидной активности использовали аскорбиновую кислоту, при изучении влияния на железо-индуцируемое аскорбат- и $НАДФН_2$-зависимое ПОЛ — кудесан (1 мл кудесана содержит 30 мг коэнзима Q_{10} и 4,5 мг витамина Е) («Аквилон»).

Число независимых определений в каждом эксперименте равнялось шести. Измерение экстинкции выполняли на биохимическом анализаторе Humalaizer 2000.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.1. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его ошибки ($M \pm m$). Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), критерия Ньюмена—Кейсла. Достоверными считались различия при $p<0,05$ [4].

Результаты

Мексидол достоверно ($p<0,05$) дозозависимо подавлял развитие глутаматиндуцируемой нейротоксичности, о чем свидетельствует значительное снижение содержания МДА в гомогенатах мозга, инкубируемых с мексидолом (рис. 1). В концентрации 10 мМ мексидол снижал содержание МДА в мозге на 42,0%, в концентрации 3 мМ — на 33,9%, в концентрации 0,5 мМ — на 23,3%, а в концентрации 0,1 мМ — на 11,5%. При изучении механизмов развития данного эффекта были получены следующие результаты. Мексидол достоверно ($p<0,05$) дозозависимо подавлял аскорбатзависимое железо-индуцируемое ПОЛ в течение 15 мин инкубации, причем по этому эффекту значительно превосходил кудесан (табл. 1). В конечной концентрации в растворе 12,5 мМ мексидол ингибировал аскорбатзависимое ПОЛ через 5 мин от начала инкубации на 65,8%, через 15 мин — на 75,9%; в концентрации 3 мМ — на 22,7 и 84,6%; в концентрации 0,3 мМ — на 39,6 и 56,5% соответственно. К 30-й минуте инкубации содержа-

Таблица 1. **Влияние мексидола и кудесана на железо-индуцируемое аскорбатзависимое ПОЛ в гомогенатах мозга (*M±m*)**

% ингибирования	12,5 мМ мексидола	3,3 мМ мексидола	0,3 мМ мексидола	1,86 мМ витамина Е, 5,72 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 400 мкл)	0,7 мМ витамина Е, 2,15 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 150 мкл)	0,186 мМ витамина Е, 0,572 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 40 мкл)	Фосфатный буфер
Через 5 мин	65,8±7,23*	22,7±2,79*	39,6±2,32*	–29,05±1,21*	29,73±2,3*	12,66±1,3*	0,00±2,34
Через 15 мин	75,9±6,51*	84,6±7,09*	56,5±6,78*	69,39±6,8*	29,54±1,66*	7,29±0,45	0,00±4,58
Через 30 мин	–18,3*±1,5	–23,33±2,21*	–16,6±1,24*	–75,76±4,34*	–0,68±0,11	–19,67±2,33*	0,00±5,33

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — достоверные различия по сравнению с пробами, не содержащими изучаемые вещества (p<0,05).

Таблица 2. **Влияние мексидола и кудесана на железо-индуцируемое $НАДФН_2$-зависимое ПОЛ в гомогенатах мозга (*M±m*)**

% ингибирования	12,5 мМ мексидола	3,3 мМ мексидола	0,3 мМ мексидола	1,86 мМ витамина Е, 5,72 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 400 мкл)	0,7 мМ витамина Е, 2,15 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 150 мкл)	0,186 мМ витамина Е, 0,572 мМ коэнзима Q_{10} (кудесан 40 мкл)	Фосфатный буфер
Через 5 мин	33,3±6,11*	–0,34±0,91	14,62±1,16*	85,42±6,33*	50,59±4,98*	6,13±0,45	0,00±6,54
Через 15 мин	35,48±3,67*	11,52±1,12*	18,43±0,99*	67,53±6,23*	57,46±2,34*	33,58±2,36*	0,00±7,26
Через 30 мин	–3,44±2,34	48,87±3,76*	31,89±2,03*	–10,78±2,34*	–26,84±2,15*	–18,12±2,11*	0,00±6,60

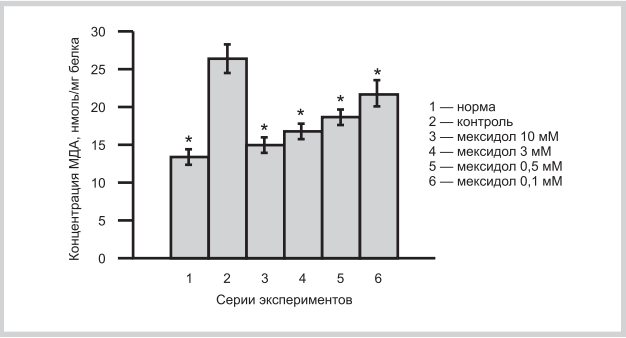


Рис. 1. **Влияние мексидола на глутамат-индуцируемую нейротоксичность (по концентрации МДА, нмоль/мг белка).**

Здесь и на рис. 2: * — достоверные различия по сравнению с пробами, не содержащими изучаемые вещества, на уровне p<0,05.

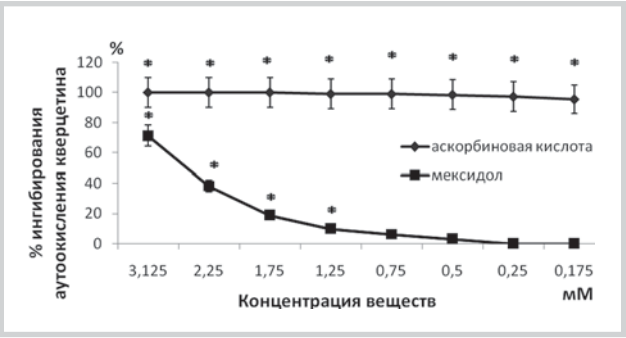


Рис. 2. **Влияние мексидола и аскорбиновой кислоты на образование активных форм кислорода (по % ингибирования аутоокисления кверцетина).**

ние мексидола, по-видимому, истощалось, и прирост уровня МДА достоверно (p<0,05) превосходил контрольные показатели на 18,3, 23,3 и 16,6% при конечных концентрациях мексидола 12,5, 3,3 и 0,3 мМ соответственно. В максимальной концентрации кудесан (1,86 мМ витамина Е, 5,72 мМ коэнзима Q_{10}) не только не подавлял, но даже активировал аскорбатзависимое ПОЛ, что можно рассматривать как его прооксидантное действие. В более низких дозировках кудесан умеренно подавлял ПОЛ в течение 15 мин инкубации. К 30-й минуте также происходило истощение содержания кудесана, и прирост МДА превосходил показатели контроля.

При изучении $НАДФН_2$-зависимого железо-индуцируемого ПОЛ установлено, что мексидол также выраженно (p<0,05) ингибировал накопление МДА (табл. 2). В концентрации 12,5 мМ — на 33,3% через 5 мин инкубации и на 35,48% — через 15 мин; в концентрации 3,3 мМ через 15 мин — на 11,5% и через 30 мин — на 48,8%; в концентрации 0,3 мМ через 15 мин — на 18,43%, а через 30 мин — на 31,9%. В отличие от этого эффект кудесана максимально проявлялся к 15-й минуте, а к 30-й минуте инкубации его содержание истощалось, и прирост МДА начинал превосходить показатели контроля.

Мексидол в концентрациях от 0,75 до 3,125 мМ подавлял аутоокисление кверцетина с 71,42 до 6,2% (p<0,05), что свидетельствует о его способности связывать супероксидный анион-радикал (рис. 2). По данному эффекту мексидол значительно уступал аскорбиновой кислоте, которая подавляла образование супероксидного анион-радикала в данных концентрациях на 100% (p<0,05).

Мексидол достоверно не влиял на активность каталазы и глутатион-SH-трансферазы (рис. 3), но значительно повышал активность Se-зависимой глутатионпероксидазы. В концентрации 1 мМ мексидол повышал активность данного фермента на 186,5% (p<0,05), а в концентрации 0,1 мМ — на 15,5% (p<0,05). Активность СОД также увеличивалась, но в меньшей степени: в концентрации мексидола 1 мМ — на 27,2% (p<0,05), а в концентрации 0,01 мМ — на 10,5% (p<0,05) (см. рис. 3).

Мексидол достоверно не повлиял на активность nNOS во всех исследуемых концентрациях (рис. 4), но в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,01 мМ ингибировал активность iNOS на 18,3 и 28,2% соответственно (p<0,05).

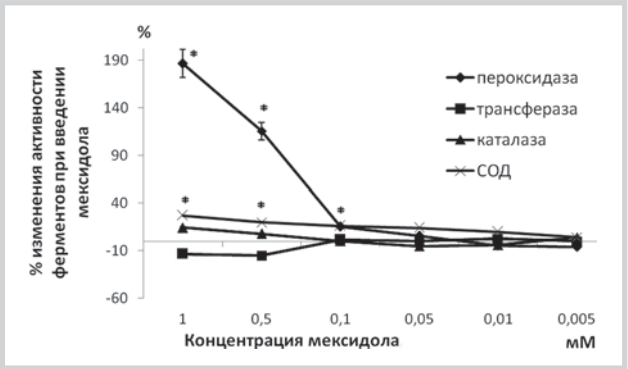


Рис. 3. **Влияние мексидола на активность антиоксидантных ферментов; *n*=6.**

Здесь и на рис. 4: * — достоверные различия по сравнению с пробами, не содержащими мексидол, на уровне $p<0,05$.

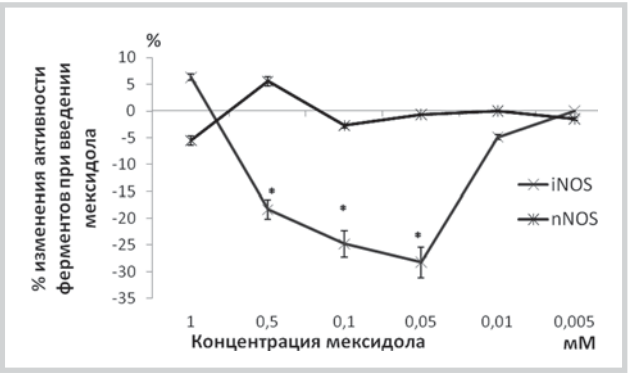


Рис. 4. **Влияние мексидола на активность nNOS и iNOS; *n*=6.**

Обсуждение

В настоящее время глутамат признан основным возбуждающим нейромедиатором ЦНС [2, 5], а перевозбуждение глутаматных рецепторов, возникающее при многих патологиях нервной системы, оказывает основное поражающее действие на нейроны. Оно реализуется посредством массивного поступления ионов кальция внутрь клетки, что в свою очередь приводит к активации образования свободных радикалов и развитию окислительного стресса [14]. При этом активные формы кислорода образуются не только в дыхательной цепи. В настоящее время доказано, что при гипоксии нейронов происходит активация $НАДФН_2$-оксидазы, которая является источником супероксидного анион-радикала [15]. Чрезмерная продукция оксида азота, обусловленная активацией как nNOS, так и iNOS, в условиях повышенного содержания супероксидного анион-радикала может приводить к образованию пероксинитрита, являющегося чрезвычайно реакционноспособным соединением [10, 13]. Показано, что экспозиция культуры корковых нейронов в растворе NMDA и ингибиторов NOS вызывает снижение нейротоксического действия глутамата [2]. Активация гемоксигеназы приводит к накоплению Fe^{2+}, катализирующего свободнорадикальные реакции.

В нашем исследовании показано, что мексидол в конечной концентрации в растворе от 10 до 0,1 мМ снижал уровень МДА в гомогенатах мозга, подвергнутого воздействию L-глутамата. Учитывая, что ведущую роль в патогенезе глутаматной нейротоксичности играют свободнорадикальные реакции, данный эффект можно рассматривать как способность мексидола подавлять эксайтотоксичность глутамата.

При изучении влияния мексидола на узловые звенья данного процесса установлено, что мексидол достоверно подавлял как аскорбатзависимое — неферментативное, так и $НАДФН_2$-зависимое — ферментативное железо-индуцируемое ПОЛ в гомогенатах мозга. Причем в отличие от кудесана в высоких концентрациях мексидол не оказывал прооксидантного действия. Данные эффекты могут быть связаны как с прямым антиоксидантным действием, т.е. со способностью мексидола непосредственно связывать свободные радикалы, так и с его влиянием на активность антиоксидантных ферментов.

В проведенном исследовании мексидол в высоких концентрациях связывал супероксидный анион-радикал, но по этой способности он значительно уступал классическому антиоксиданту аскорбиновой кислоте. Мексидол не влиял на активность 1-изофермента глутатион-SH-трансферазы и каталазы, однако значительно повышал активность Se-зависимой глутатионпероксидазы. Считается, что утилизируя перекись водорода и органические перекиси, глутатионпероксидаза играет наибольшую роль в защите клеток от гипоксии [9]. Таким образом, данный эффект может лежать в основе выраженного антигипоксического действия изучаемого препарата. Также мексидол умеренно повышал активность СОД. Но, учитывая, что мексидол обладает прямым антисупероксидным действием, т.е. способен непосредственно связывать супероксидный анион-радикал, который является субстратом СОД, по-видимому, выявленное умеренное повышение активности СОД связано не со способностью препарата влиять на активность фермента, а с его прямым антирадикальным действием.

При изучении влияния мексидола на активность NOS выявлено, что изучаемый препарат не влиял на активность нейрональной, но умеренно подавлял активность индуцибельной изоформы. Так как при патологических состояниях повышается активность в основном индуцибельной изоформы (отсюда ее название), то данный эффект мексидола может играть существенную роль в повышении резистентности нейронов к гипоксии.

Таким образом, на основе проделанной работы можно заключить, что мексидол в экспериментах *in vitro* дозозависимо подавляет развитие глутамат-индуцируемой нейротоксичности, дозозависимо подавляет развитие аскорбатзависимого (неферментативного) и $НАДФН_2$-зависимого (ферментативного) железо-индуцируемого ПОЛ, в высоких концентрациях обладает способностью связывать супероксидный анион-радикал, значительно повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы и умеренно снижает активность индуцибельной iNOS.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Под ред. В.Х. Хавинсона. Ст-Петербург 2000; 251.
2. *Башкатова В.Г., Раевский К.С.* Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата. Биохимия 1998; 63: 7: 1020—1028.
3. *Гаврилова В.Б., Гаврилова А.Р., Мазул Л.М.* Анализ методов определения продуктов ПОЛ. Вопр мед химии 1987; 1: 118—120.
4. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М: Практика 1998; 459.
5. *Давыдова О.Н., Болдырев А.А.* Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем. Анналы клин и эксперим неврологии 2007; 1: 4: 28—34.
6. *Зарубина И.В., Шабанов П.Д.* Молекулярная фармакология антигипоксантов. Ст-Петербург: ООО «Издательство Н-Л» 2004; 368.
7. *Караваев Е.Н., Попова И.Ю., Кичигина В.Ф.* Влияние глутамата на активность нейронов медиальной септальной области in vitro. Фундам исслед 2005; 3: 18—22.
8. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопр мед химии 1990; 36: 2: 88—91.
9. *Ланкин В.З., Гуревич С.М.* Ингибирование переокисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте. ДАН СССР 1976; 226: 3: 705—708.
10. *Реутов В.П.* Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. Вестник РАМН 2000; 4: 35—41.
11. *Сумбаев В.В., Ясинская И.М.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге. Соврем пробл токсикологии 2000; 3: 3—7.
12. Федеральное руководство для врачей (формулярная система), выпуск III. М 2002; 234—240.
13. *Bidmon H.-J., Emde B., Kowalski T. et al.* Nitric oxide synthase-I containing cortical interneurons co-express antioxidative enzymes and anti-apoptotic Bcl-2 following focal ischemia: evidence for direct and indirect mechanisms towards their resistance to neuropathology. J Chem Neuroanat 2001; 22: 167—184.
14. *Chan P.H.* Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21: 1: 2—14.
15. *Chen H., Song Y.S., Chan P.H.* Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab 2009; 29: 7: 1262—1272.
16. *Keen J.N., Iakoby W.B.* Glutathione transferases catalysis of nucleophylic reactions of glutathione. Biol Chem 1978; 253: 16: 5854—5858.