



Н.О. Власенко

**ВМІСТ ГЛУТАТІОНУ В ЕРИТРОЦИТАХ І КІСТКОВОМУ МОЗКУ ТВАРИН
ПРИ ЗАСТОСУВАННІ МЕКСИДОЛУ ЗА УМОВ ГОСТРОГО СТРЕСУ***Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава**Ключові слова: мексидол, глутатіон, стрес, еритроцити, кістковий мозок.*

У білих щурів-самців моделювали гострий іммобілізаційний стрес та його фармакологічну корекцію мексидолом (2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат). Препарат вводили в дозі 100 мг/кг перед стресорним впливом з подальшим вивченням вмісту глутатіону та його фракцій (GSH, GSSG) в еритроцитах і кістковому мозку тварин у різні терміни постстресорного періоду. Показано, що мексидол підвищує рівень GSH як в еритроцитах, так і в мієлоїдній тканині в терміни від 3 годин до 5 діб після стресу. Він закономірно збільшує вміст загального глутатіону в еритроцитах у стадію тривоги стрес-синдрому (3–24 год). Такий ефект препарату, імовірно, є наслідком його прямої антиоксидантної дії, що знижує навантаження на фізіологічну антиоксидантну систему і сприяє нормальній функціональній активності центральної та периферичної ланок еритроциту при стресі.

Содержание глутатиона в эритроцитах и костном мозге животных при использовании мексидола в условиях острого стресса

Н.А. Власенко

У белых крыс-самцов моделировали острый иммобилизационный стресс и его фармакологическую коррекцию мексидолом (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат). Препарат вводили в дозе 100 мг/кг перед стрессорным воздействием с последующим изучением содержания глутатиона и его фракций (GSH, GSSG) в эритроцитах и костном мозге животных в различные сроки постстрессорного периода. Показано, что мексидол повышает уровень GSH как в эритроцитах, так и в миелоидной ткани в сроки от 3 часов до 5 суток после стресса. Он закономерно увеличивает содержание общего глутатиона в эритроцитах в стадию тревоги стресс-синдрома (3–24 часа). Такой эффект препарата, по-видимому, является следствием его прямого антиоксидантного действия, которое снижает нагрузку на физиологическую антиоксидантную систему и способствует поддержанию нормальной функциональной активности центрального и периферического звена эритрона при стрессе.

*Ключевые слова: мексидол, глутатион, стресс, эритроциты, костный мозг.***Glutathione content in erythrocytes and bone marrow of animals in mexidol use under the conditions of acute stress**

N.O. Vlasenko

Acute immobilization stress and its pharmacological correction with mexidol (2-ethyl-6-methyl-3-oxypyridine succinate) were modeled in albino male rats. The drug was administered to animals in dose 100 mg/kg before stress exposure with following investigation of content of glutathione and its fractions (GSH, GSSG) in different terms of post-stress period. It is shown that mexidol enhances the level of reduced glutathione (GSH) in erythrocytes as well as in myeloid tissue in terms from 3 hrs to 5 days after the stress. It also regularly increases common glutathione concentration in erythrocytes in alarm stage of stress-syndrome (3-24 hrs). Such effect of mexidol, probably, is the consequence of its direct antioxidant action which lowers the load on physiological antioxidant system and promotes the maintenance of normal functional activity of erythron's central and peripheral parts in stress.

Key words: mexidol, glutathione, stress, erythrocytes, bone marrow.

Відомо, що метаболічні зміни в еритроцитах при дії екстремальних подразників-стресорів виявляються змінами мембран еритроцитів, співвідношення між пентозо-фосфатним шляхом перетворення глюкози та гліколізом, а також порушенням їх прооксидантно-антиоксидантного балансу [9]. Провідну роль в антиоксидантній системі еритроцитів відіграють низькомолекулярні речовини, особливо глутатіон, наявний в окисленій (GSSG) і відновленій формі (GSH) [15]. Його роль пов'язана з тим, що SH-вмісні сполуки окислюються в першу чергу, захищаючи від окислення інші функціональні групи [12]. Збереження глутатіону у відновленому стані відбувається за участю НАДФН, що утворюється в пентозо-фосфатному циклі і необхідне як для захисту тіолових ферментів і клітинної мембрани від активних метаболітів кисню, так і для запобігання необоротного окисного денатурування гемоглобіну [11]. Якщо система глутатіону в еритроцитах достатньо досліджена за умов стресу та його фармакологічної корекції [7,8], то відомостей щодо її функціонування в

кістковому мозку значно менше [13]. Зокрема, не виявили даних щодо впливу синтетичного антиоксиданту мексидолу (2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату) [5] на рівень глутатіону в мієлоїдній тканині, хоча серед його фармакологічних ефектів є здатність регулювати клітинні реакції кісткового мозку мієлосупресії, викликаній цитостатиками або іонізуючою радіацією [1,3].

МЕТА РОБОТИ

Порівняти вплив мексидолу на вміст загального глутатіону та його фракцій в еритроцитах і кістковому мозку тварин за умов гострого іммобілізаційного стресу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти виконано на 80 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар. На проведення дослідів отримано дозвіл комісії з питань біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Гострий іммобілізаційний стрес за Н. Selye (1936) відтворювали шляхом іммобілізації щурів на спині протягом 3 год [6]. Мексидол (2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинат) вводили тваринам у вигляді 5%



розчину для ін'єкцій (ООО Медицинский центр «Эллара», РФ) в ефективній дозі 100 мг/кг. Препарат ін'єкціювали інтраперитонеально за 30 хв перед початком стресорного впливу. Через 3, 12, 24 та 48 год, а також через 5 діб від початку стресу щурів піддавали евтаназії під тіопенталовим наркозом, забираючи кров з серця до його зупинки. Інтактні тварини на початку експерименту слугували контролем. Гострий стрес без фармакологічної корекції розглядали як контрольну патологію. У крові та гомогенаті кісткового мозку стегнової кістки щурів досліджували вміст GSH і GSSG за методом Lee Kum-Tatt [14] в модифікації В.Г. Чернишова [10]. Концентрацію глутатіону в зразках визначали за калібрувальним графіком і виражали в пмоль $\times 10^{-3}$ /еритроцит або нмоль/10⁶ клітин кісткового мозку, для чого підраховували загальну кількість еритроцитів у крові та загальну кількість міелокаріоцитів [6]. Отримані результати статистично оброблено за допомогою стандартних комп'ютерних програм Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При відтворенні контрольної патології показано, що через 3 год після стресу вміст загального глутатіону в еритроцитах знижується в 1,4 рази ($p < 0,05$), а GSH – в 1,9 рази ($p < 0,02$) порівняно з контролем, але істотних змін вмісту GSSG не відбувається (табл. 1). Через 12 та 24 год спостерігається лише зменшення концентрації GSH ($p < 0,001$) за відсутності суттєвих змін концентрації GSSG і загального глутатіону. Через 48 год після стресу рівень GSH в еритроцитах знижується в 3,3 рази ($p < 0,001$), GSSG має тенденцію до зниження в 1,3 рази ($p < 0,1$) порівняно з показниками інтактних тварин на початку експерименту. Це супроводжується зменшенням вмісту загального глутатіону в 1,7 рази ($p < 0,005$). Описаний рівень глутатіону та його фракцій зберігається в еритроцитах і через 5 діб після стресу.

Мексидол запобігає як раннім, так і пізнім стресорним порушенням вмісту глутатіону в еритроцитах (табл. 1). Зокрема, через 3 год після стресу на фоні дії препарату вміст GSH вірогідно вищий ($p < 0,01$) за такий при контрольній патології. Загальний глутатіон також зростає ($p < 0,005$) і не відрізняється від показників інтактних тварин. У терміні 12 год після стресу з введенням мексидолу препарат не тільки запобігає зменшенню вмісту глутатіону та його фракцій в еритроцитах, але й підвищує їх рівень порівняно з контролем. Аналогічну ситуацію спостережено під впливом мексидолу через 24 год від початку стресорного впливу, коли препарат збільшує вміст загального глутатіону та GSH ($p < 0,001$) і зумовлює тенденцію до зростання GSSG. У пізні терміни експерименту дія мексидолу стосується підтримання рівня GSH порівняно з контрольною патологією. Привертає увагу, що через 5 діб під впливом препарату в еритроцитах також зменшується концентрація GSSG. Протягом усього часу спостережень за розвитком стрес-синдрому на фоні введення мексидолу концентрація GSH переважає таку при стресі без фармакокорекції, що можна розцінювати як позитивний ефект, спрямований на забезпечення нормальних морфофункціональних властивостей еритроцитів.

Загальний адаптаційний синдром, зумовлений 3-годинною іммобілізацією тварин, характеризується змінами системи глутатіону не тільки в еритроцитах, але й у кістковому мозку (табл. 2). Зокрема, через 3 год від початку дії стресору вміст GSH знижується в 1,5 рази ($p < 0,005$), а вміст GSSG зростає в 1,9 рази ($p < 0,001$) порівняно з вихідним рівнем. При цьому рівень загального глутатіону істотно не змінюється. Через 12 год розвиток стрес-синдрому характеризується зниженням GSH і зростанням GSSG у клітинах кісткового мозку, а також зменшенням рівня загального глутатіону в 1,3 рази ($p < 0,005$). Аналогічну спрямованість зрушень

Таблиця 1

Вплив мексидолу на вміст глутатіону в еритроцитах при гострому іммобілізаційному стресі ($M \pm m$)

Термін спостережень	Характер впливу	Глутатіон, пмоль $\times 10^{-3}$ /еритроцит		
		загальний	ВГ	ОГ
Початок	Інтактні (13)	0,886 \pm 0,096	0,298 \pm 0,033	0,573 \pm 0,074
3 год	Стрес (6)	0,636 \pm 0,047*	0,156 \pm 0,038*	0,480 \pm 0,034
	Стрес + мексидол (7)	0,860 \pm 0,038**	0,304 \pm 0,027**	0,556 \pm 0,032
12 год	Стрес (8)	0,698 \pm 0,047	0,102 \pm 0,013*	0,596 \pm 0,037
	Стрес + мексидол (8)	1,13 \pm 0,072***	0,330 \pm 0,03**	0,802 \pm 0,051***
24 год	Стрес (7)	0,752 \pm 0,063	0,122 \pm 0,02*	0,630 \pm 0,047
	Стрес + мексидол (7)	1,158 \pm 0,114**	0,391 \pm 0,047**	0,768 \pm 0,074
48 год	Стрес (6)	0,521 \pm 0,029*	0,090 \pm 0,016*	0,431 \pm 0,023
	Стрес + мексидол (6)	0,621 \pm 0,066	0,215 \pm 0,023**	0,406 \pm 0,047
5 діб	Стрес (6)	0,425 \pm 0,019*	0,080 \pm 0,012*	0,344 \pm 0,02*
	Стрес + мексидол (6)	0,396 \pm 0,032*	0,190 \pm 0,023***	0,206 \pm 0,029***

Примітки: у дужках наведено кількість спостережень; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем (інтактні тварини); ** – $p < 0,05$ порівняно з контрольною патологією (стрес без введення мексидолу).



Вплив мексидолу на вміст глутатіону в кістковому мозку при гострому іммобілізаційному стресі (M±m)

Термін спостережень	Характер впливу	Глутатіон, нмоль/10 ⁶ клітин		
		загальний	ВГ	ОГ
Початок	Інтактні (13)	26,7±1,2	16,4±0,7	10,2±1,9
3 год	Стрес (8)	30,0±2,7	10,9±1,5*	19,1±1,4*
	Стрес + мексидол (7)	35,8±1,2*	19,6±0,9**	16,2±0,9*
12 год	Стрес (8)	20,8±1,4*	7,5±0,8*	13,3±0,8*
	Стрес + мексидол (7)	24,3±0,9	13,3±0,6**	11,0±0,7**
24 год	Стрес (7)	21,1±1,3*	6,0±0,7*	15,1±0,8*
	Стрес + мексидол (7)	26,3±1,1**	12,4±0,8**	13,9±0,6
48 год	Стрес (6)	24,5±2,3	8,2±0,9*	16,3±1,7*
	Стрес + мексидол (6)	28,0±3,9	13,8±3,7**	14,2±1,0
5 дб	Стрес (6)	15,9±0,5*	10,0±1,0*	5,9±0,6*
	Стрес + мексидол (6)	18,5±1,1*	12,9±0,8**	5,6±0,4*

Примітки: у дужках наведено кількість спостережень; * – $p < 0,05$ порівняно з контролем (інтактні тварини); ** – $p < 0,05$ порівняно з контрольною патологією (стрес без введення мексидолу).

спостерігають у наступні терміни постстресорного періоду, а найнижчу концентрацію глутатіону та його фракцій реєструють в кістковому мозку через 5 дб після стресу (в стадію резистентності стрес-синдрому), що може бути пов'язано зі зростанням клітинності кісткового мозку у цей період [6]. Наведені дані дозволяють зазначити, що в мієлоїдній тканині протягом 5 дб розвитку стрес-синдрому має місце переважне виснаження пулу GSH, що подібно до такого в еритроцитах.

Під впливом мексидолу через 3 год після стресу вміст GSH у кістковому мозку тварин у 1,9 рази ($p < 0,001$) вищий за такий при контрольній патології (табл. 2). Концентрація GSSG і загального глутатіону не зазнає вірогідних змін порівняно з аналогічними показниками при стресі без фармакологічної корекції. У наступному терміні спостережень (через 12 год) препарат сприяє підтриманню в кістковому мозку пулу GSH ($p < 0,001$) та зниженню рівня GSSG ($p < 0,05$) порівняно з контрольною патологією. Аналогічна спрямованість процесів, що стосуються вмісту GSH у мієлоїдній тканині, простежується при застосуванні мексидолу й надалі (табл. 2). Отже, під дією препарату співвідношення GSH/GSSG у кістковому мозку протягом усього періоду спостережень виявляється зрушеним в бік GSH на відміну від такого при стресі без введення мексидолу.

Отримані результати свідчать, що мексидол має односпрямований протективний вплив стосовно редокс-системи глутіону в еритроцитах і кістковому мозку за умов оксидативного стресу, що супроводжує загальний адаптаційний синдром. Така дія має місце й у стадію тривоги, що триває до 48 год, і в стадію резистентності, яку реєструють через 48 год і надалі [6]. Це узгоджується з даними спеціалізованої літератури щодо характеру дії препарату на рівень глутатіону в крові за інших експериментальних і клінічних ситуацій [2] і може бути наслідком його прямої антиоксидантної дії, завдяки якій зменшується навантаження на фізіологічну антиоксидантну систему й підтримується рівень відновлених

форм низькомолекулярних антиоксидантів, зокрема глутатіону. У центральній ланці еритронару зазначений ефект мексидолу, вочевидь, сприяє нормальній проліферативній активності мієлокаріоцитів, а в периферичній – запобіганню стресорних порушень газотранспортної функції еритроцитів і їх резистентності. Вивчення взаємозв'язків між рівнем глутатіону та клітинними реакціями системи еритронару становитиме напрямом наших подальших досліджень.

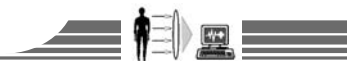
ВИСНОВКИ

1. Гострий іммобілізаційний стрес (3 год) викликає виснаження пулу GSH в еритроцитах і кістковому мозку білих щурів, що спостерігається в період від 3 год до 5 дб після стресу й в окремі терміни супроводжується зниженням загального глутатіону.

2. Мексидол (100 мг/кг), введений перед гострим іммобілізаційним стресом, односпрямовано запобігає змінам вмісту GSH в еритроцитах і кістковому мозку протягом 5 дб постстресорного періоду, але з більшою регулярністю підвищує загальний глутатіон в еритроцитах у стадію тривоги стрес-синдрому (3–24 год).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Важнича О.М. Дослідження екстрацеребральних ефектів мексидолу в експерименті та клініці / О.М. Важнича, Т.О. Дев'яткіна // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – №4 (11). – С. 47–55.
2. Верлан Н.В. Система глутатіона при ліченні мексидолом у больных хроничекой церебральной ишемией / Н.В. Верлан // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 43, №5. – С. 186–188.
3. Влияние мексидола на миелосупрессивную токсичность, а также на противоопухолевую и антиметастатическую эффективность циклофосфана / А.В. Сипров, В.И. Инчина, А.С. Кинзирский [и др.] // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, №6. – С. 711–714.
4. Влияние мексидола на пострадиационное восстановление системы гемопоза / В.В. Мороз, Ю.Б. Дешевой, Г.В. Сукоян [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, №1. – С. 91–96.
5. Воронина Т.А. Мексидол. Основные эффекты, механизм дей-



- ствия, применение / Т.А. Воронина. – М., 2005. – 20 с.
6. *Горизонтов П.Д.* Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов, О.И. Белоусова, М.И. Федотова. – М.: Медицина, 1983. – 240 с.
 7. *Колосова М.В.* Изменение активности глутатион-трансферазы эритроцитов, продуцированных в условиях напряженного эритропоэза / М.В. Колосова, А.М. Кудряшов, Н.М. Титова // Актуальные проблемы биологии: сборник научных работ. – Томск, 2004. – С. 81–82.
 8. *Лантева И.А.* Соотношение между прооксидантной и антиоксидантной системами в эритроцитах при иммобилизационном стрессе у крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / И.А. Лантева. – Н. Новгород, 2009. – 21 с.
 9. Типовая реакция периферического звена эритрона при патологических процессах / Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, М.В. Колосова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2001. – Т. 1, №1. – С. 29–35.
 10. *Чернышов В.Г.* Определение восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах беременных женщин / В.Г. Чернышов // Лабораторное дело. – 1983. – №3. – С. 31–33.
 11. *Beutler E.* Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. In: Free Medical Textbook. Williams Haematology [Electronic resource] / *Beutler E.* – Search regimen: <http://medtextfree.wordpress.com/2011/12/26/chapter-26-energy-metabolism-and-maintenance-of-erythrocytes>.
 12. Glutathione, cell proliferation and differentiation / *H.R. Ahmadi Ashtiani, A.K. Bakshandi, M. Rahbar [et al.]* // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, №34. – P. 6348–6363.
 13. Increased myeloproliferation in glutathione S-transferase π -deficient mice is associated with a deregulation of JNK and Janus kinase / *L. Gate, R.S. Majumdar, A. Lunk [et al.]* // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279. – P. 8608–8616.
 14. *Kum-Tatt L.* A new colorimetric method for the determination of glutathione in erythrocytes / *L. Kum-Tatt, I.K. Tan* // Clin. Chim. Acta. – 1974. – Vol. 53, №2. – P. 153–161.
 15. *Kurata M.* Glutathione regeneration in mammalian erythrocytes / *M. Kurata, M. Suzuki, N.S. Agar* // Comparative Haematology International. – 2000. – Vol. 10, №2. – P. 59–67.

Відомості про автора:

Власенко Н.О., асистент каф. експериментальної та клінічної фармакології ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Поступила в редакцію 11.01.2013 г.