

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев,
Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова

Глутатион-зависимые механизмы нейропротективного действия нового метаболитотропного препарата «Ангиолин» в условиях индукции нитрозирующего стресса *in vitro*

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: ангиолин, нейропротекция, тиол-дисульфидная система, глутатион, нитрозирующий стресс

Исследованиями последнего десятилетия раскрыта роль активных форм кислорода и азота в инициации апоптоза и некроза нейронов при ряде нейродегенеративных заболеваний [1]. Известно, что нейродеградация ишемического генеза сопровождается развитием сложных патобиохимических каскадов в нейроне, а именно интенсификацией процессов свободно-радикального окисления, дисбалансом тиол-дисульфидной системы (ТДС), энергетическим дефицитом. По некоторым данным состояние тиол-дисульфидной системы в условиях ишемии головного мозга является определяющим фактором в развитии митохондриальной дисфункции, и как следствие, в гибели клетки [2].

Кроме того, в настоящее время показана значительная трансмиссивная, антиоксидантная, детоксикационная, антиапоптотическая роль глутатиона – основного интермедиата тиол-дисульфидной системы в физиологических процессах нейрональной клетки [3].

Однако полученные данные не систематизированы, некоторые аспекты противоречивы, что обуславливает актуальность дальнейших исследований системы глутатиона в нервных клетках. Значение глутатиона в регуляции многих защитных функций нейрона в неблагоприятных условиях определяет глутатионовое звено тиол-дисульфид-

ной системы как перспективную мишень для фармакокоррекции при патологии ЦНС. В этом отношении имеют хорошую экспериментальную рекомендацию модуляторы системы глутатиона – селеназа, ацетилцистеин, элтацин, глутатион, α -липоевая кислота [3, 4]. Научные исследования в области изыскания вторичных нейропротекторов с антиоксидантным механизмом действия указывают на перспективность производных 1,2,4-триазолил-5-тиокарбоновых кислот, обладающих метаболитотропным и антиоксидантным действием. Ярким примером является препарат «Тиотриазолин» [4]. Вышеизложенное явилось обоснованием для создания в НПО «Фарматрон» принципиально нового препарата оригинальной структуры – (S)-2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата («Ангиолин»), проявляющего противоишемические, эндотелиопротективные, митопротективные, антиоксидантные свойства [5]. К сожалению, до настоящего времени нет единого представления об интимных молекулярно-биохимических механизмах нейропротективного действия Ангиолина.

Цель исследования – изучение нейропротективного действия Ангиолина по влиянию на сопряженные показатели нитрозирующего стресса и системы глутатиона, а также нейроапоптоза при депривации глутатионового звена тиол-дисульфидной системы нейронов *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования проведены в соответствии с Директивой

Европейского Союза 2010/10/63 ЕУ относительно экспериментов на животных. Для исследований *in vitro* нейроны выделяли из коры головного мозга 10-дневных крысят линии Вистар. Для получения нейронов животных декапировали и быстро извлекали мозг. Кору головного мозга отделяли от белого вещества, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7,5 % поливинилпирролидона (ПВП), 1 % бычий сывороточный альбумин (БСА) и 10 ммоль/л CaCl_2 . Полученную суспензию фильтровали под незначительным давлением, создаваемым водоструйным насосом, на тefлоновой воронке с двумя нейлоновыми ситами – 258 мкм и 82 мкм и металлическим ситом с диаметром пор 58 мкм. После последовательного пропускания через сита клеточную суспензию наслаивали на градиент, состоящий из 6 мл 1 моль/л и 5 мл 1,75 моль/л сахарозы на 1 % бычьего сывороточного альбумине, и центрифугировали при 60 000 g 30 мин ($t + 10$ °C) в рефрежераторной центрифуге SIGMA 3-30K. В результате центрифугирования получали два слоя и плотный осадок. Верхний слой был представлен остатками миелиновых оболочек, второй слой состоял из глиальных и нейрональных клеток. Осадок был представлен телами нейронов со степенью чистоты 90 %. Второй слой суспендировали в среде (7,5 % ПВП, 5 % фикоλλα, 1 % бычьего сывороточного альбумина) и пропускали через сито 58 мкм, а затем наслаивали на градиент (3 мл 30 % фикоλλα, 6 мл 1,2 моль/л сахарозы и 5 мл 1,65 моль/л сахарозы) и центрифугировали как указано выше. Полученный в результате осадок, содержащий нейроны с примесью нейроглии и капилляров, суспендировали в 0,25 моль/л сахарозе и фильтровали через сито 58 мкм. Затем наслаивали на градиент (6 мл 1,0 моль/л и 5 мл 1,75 моль/л сахарозы) и центрифугировали как указано выше. Полученный осадок содержит 90 % нейронов. Выделенные нейрональные клетки объединяли и отмывали охлажденным физиологическим раствором (+ 4 °C) [6].

Депривацию глутатионового звена тиол-дисульфидной системы осуществ-

ляли путем введения в инкубационную среду 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB) – селективного ингибитора глутатион-S-трансферазы, образующего конъюгаты с глутатионом в цитозольной и митохондриальной фракциях [6]. CDNB вносили в концентрации 80 мкмоль/л с последующей инкубацией нейрональной суспензии 15, 30 и 60 мин при температуре 37 °C.

Интенсивность оксидативного стресса оценивали по степени накопления маркера нитрозативного стресса – нитротирозина, который определяли иммуноферментным методом с использованием стандартного тест-набора «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology», Нидерланды) согласно прилагаемой инструкции.

Состояние тиол-дисульфидной системы изучали по содержанию окисленного и восстановленного глутатиона и активности ферментов – глутатион-S-трансферазы (Г-S-T), глутатионредуктазы (ГР) в суспензии нейронов. Уровень окисленных и восстановленных форм глутатиона определяли флюориметрически по реакции с о-фтаальвым ангидридом [7]. Определение активности ГР основывалось на измерении скорости окисления NADPH, которая регистрировалась спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Активность Г-S-T определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между восстановленной формой глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) [8]. Количество дегенеративно измененных клеток определяли по окраске препаратов нитритом серебра [9].

Первоначальными исследованиями нами был найден диапазон доз, в котором Ангиолин (НПО «Фарматрон», Украина) проявляет нейропротекторный эффект – 0,1–10,0 мкмоль/л. Для этого Ангиолин вносили в концентрации 0,05; 0,1; 1,0; 5,0 и 10,0 мкмоль/л в инкубационную среду за 30 мин до внесения CDNB. Препараты сравнения – Тиотриазолин («Артериум», Украина) и α -липоевую кислоту («Марбиофарм», Россия) вносили в концентрации 0,1 мкмоль/л.

Все экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметиче-

ского (M) и стандартной ошибки репрезентативности среднего арифметического (m). Результаты исследования обработаны с использованием статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «Microsoft Excel 2010». Статистическую обработку проводили с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия с уровнем значимости менее 0,05 (95 %) [10].

Результаты и их обсуждение. Внесение в суспензию нейронов CDNB приводило к депривации глутатионового звена тиол-дисульфидной системы, о чем свидетельствует дефицит восстановленных форм глутатиона при торможении активности ГР и Г-S-T. Это, в свою очередь, вызывает неконтролируемую продукцию активных форм кислорода и азота и развитие нитрозативного стресса, доказательством чего служит отмеченное повышение уровня нитротирозина в нейрональной суспензии (табл. 1).

Проведенные исследования показали, что внесение CDNB в концентрации 80 мкмоль/л приводило к повышению

маркера нитрозативного стресса – нитротирозина более чем в 2,2 раза – на 127,2 %. Кроме того, наблюдалось смещение тиол-дисульфидного равновесия в сторону окисленных тиолов, о чем свидетельствует снижение уровня глутатиона восстановленного (в 6,6 раза), и увеличение в 3 раза его окисленной формы на фоне снижения активности ключевых ферментов тиол-дисульфидной системы – Г-S-T – в 2,7 раза и ГР – в 2,3 раза по отношению к контрольным пробам на 60 мин инкубации (табл. 1).

Важно отметить, что выше описанные патобиохимические изменения приводили к усилению процессов клеточной гибели в суспензии нейронов, о чем свидетельствовало статистически достоверное ($p \leq 0,05$) повышение количества дегенеративно измененных нейронов в тесте с нитритом серебра (табл. 1).

Возможным механизмом запуска клеточной гибели нейронов, инкубированных с CDNB, является, по нашему мнению, нарушение тиол-дисульфидного равновесия и формирование митохондриальной дисфункции.

Было установлено, что дефицит глутатиона приводит к развитию нитрозативного стресса, в результате которого

Таблица 1

Показатели тиол-дисульфидной системы и количество дегенеративно измененных клеток в нейрональной суспензии после добавления CDNB,

$M \pm m$ ($n = 7$)

Показатель	Контрольная суспензия			Суспензия нейронов после инкубации с 80 мкМ CDNB		
	15 мин	30 мин	60 мин	15 мин	30 мин	60 мин
Нитротирозин, нмоль/г белка	3,60 ± 0,16	3,92 ± 0,18	4,01 ± 0,15	4,84 ± 0,47	5,05 ± 0,36	9,11 ± 0,43*
Количество дегенеративно измененных клеток в видимом поле	12,60 ± 0,99	12,90 ± 1,09	13,2 ± 1,06	17,40 ± 1,31	20,80 ± 1,03	60,60 ± 2,98*
Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка	3,79 ± 0,11	3,75 ± 0,14	3,31 ± 0,18	3,55 ± 0,16	2,62 ± 0,18	0,50 ± 0,05*
Глутатион окисленный, мкмоль/г белка	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,51 ± 0,03*
Активность Г-S-T, у. е./мг белка	28,04 ± 0,25	27,51 ± 0,73	25,73 ± 0,26	31,64 ± 0,29	24,20 ± 0,28	9,41 ± 0,18*
Активность ГР, у. е./мг белка	13,12 ± 0,19	12,30 ± 0,23	12,82 ± 0,32	13,0 ± 0,77	12,68 ± 0,19	5,48 ± 0,16*

*Примечание. * $p \leq 0,01$ по отношению к контрольной суспензии.*

происходит взаимодействие цитотоксических дериватов NO с алифатическими и ароматическими аминами, образуя N-нитроамины, о чем может свидетельствовать повышение содержания нитротирозина. Оксид азота взаимодействует с цистеином с образованием S-нитроцистеина и с глутатионом с образованием S-нитроглутатиона [4]. S-нитроглутатион является основной транспортной молекулой переноса NO [3]. Некоторыми исследованиями установлено, что транспорт NO происходит с образованием N_2O_3 , который затем нитрозилирует тиолы, еще более истощая запасы глутатиона и смещая тиол-дисульфидное равновесие [8]. Кроме того, неконтролируемый рост активных метаболитов NO приводит к окислению белков дыхательной цепи митохондрий и инактивации митохондриальной супероксиддисмутазы, что еще более истощает антиоксидантную систему нейрона [4].

С целью фармакокоррекции *in vitro* данных патологических изменений нейрона нами был использован препарат «Ангиолин». Интегральным показателем нейропротективной эффективности изучаемых лекарственных средств является их способность повышать количество выживших клеток в суспензии нейронов с добавлением CDNB.

Из рисунка видно, что наиболее эффективной концентрацией для пре-

парата является 0,1 мкмоль/л. В этой концентрации Ангиолин снижал количество дегенеративно измененных нейронов в 2,8 раза по отношению к контролю. Повышение концентрации не приводило к повышению активности препарата. Для исследования механизмов нейропротективного действия Ангиолина нами была изучена его способность в концентрации 0,1 мкмоль/л влиять на показатели антиоксидантной и тиол-дисульфидной систем в суспензии нейронов при добавлении CDNB.

Биохимическими исследованиями установлено, что введение в инкубационную среду Ангиолина в концентрации 0,1 мкмоль/л приводило к уменьшению выраженности нитрозативного стресса, о чем свидетельствует снижение содержания нитротирозина на 53,2 % (табл. 2), а также к восстановлению тиол-дисульфидного равновесия. В пользу последнего свидетельствует повышение концентрации восстановленного глутатиона (в 6,3 раза), снижение его окисленной формы (в 2 раза), повышение активности ферментов тиол-дисульфидной системы – Г-S-T и ГР на 91,9 % и 87,6 % соответственно (табл. 2).

Важно отметить, что Ангиолин статистически достоверно ($p \leq 0,05$) превышал эффекты α -липоевой кислоты и тиотриазолина относительно уровня нитротирозина, восстановленной

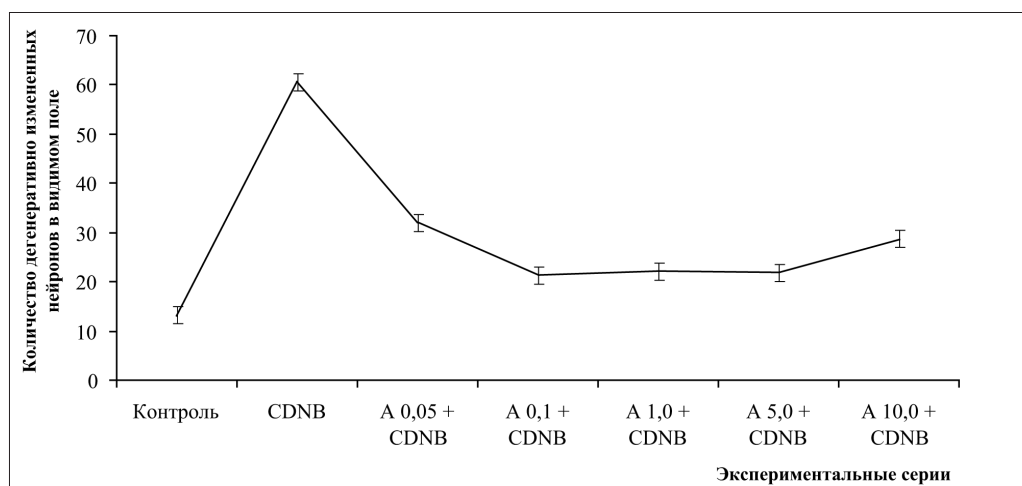


Рисунок. Количество дегенеративно измененных нейронов в нейрональной суспензии при инкубации с Ангиолином и последующим внесением CDNB

Примечание. В каждой экспериментальной серии $n = 7$; $*p \leq 0,05$ по отношению к суспензии с CDNB; А – Ангиолин в указанной дозе, мкмоль/л

Показатели антиоксидантной и тиол-дисульфидной систем в суспензии нейронов, инкубированных с Ангиолином, тиотриазолином и α -липовой кислотой и последующем внесении CDN, $M \pm m$ ($n = 7$)

Показатель	Суспензия нейронов с добавлением CDN (80 мкмоль/л)	Ангиолин (0,1 мкмоль/л) + CDN	α -липовая кислота (0,1 мкмоль/л) + CDN	Тиотриазолин (0,1 мкмоль/л) + CDN
Нитротирозин, у. е./мг белка	9,11 \pm 1,43	4,26 \pm 0,27* ^{&1}	7,22 \pm 0,66	5,84 \pm 0,37*
Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка	0,50 \pm 0,15	3,18 \pm 0,27* ^{&1}	1,17 \pm 0,27	2,80 \pm 0,15*
Глутатион окисленный мкмоль/г белка	0,510 \pm 0,089	0,250 \pm 0,037* ^{&}	0,400 \pm 0,075*	0,310 \pm 0,028*
Активность Г-S-T, у. е./мг белка	9,41 \pm 0,88	18,06 \pm 1,18* ^{&}	11,74 \pm 1,73	15,90 \pm 0,92*
Активность ГР, у. е./мг белка	5,48 \pm 1,16	10,28 \pm 0,99* ^{&}	7,25 \pm 1,41	9,11 \pm 0,59*
Количество дегенеративно измененных клеток в видимом поле	60,60 \pm 8,98	21,3 \pm 1,32* ^{&1}	54,20 \pm 6,87	49,40 \pm 2,19* ^{&}

Примечание: * $p \leq 0,05$ по отношению к суспензии с добавлением CDN; [&] $p \leq 0,05$ по отношению к α -липовой кислоте; ¹ $p \leq 0,05$ по отношению к тиотриазолину.

формы глутатиона и количества дегенеративно измененных клеток в нейрональной суспензии (табл. 2).

Таким образом, проведенными экспериментальными исследованиями было установлено, что реализация нейропротективного действия Ангиолина связана с его позитивным влиянием на глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы. Мы предполагаем, что выявленный механизм связан не только с антиоксидантными свойствами указанного препарата, обусловленными наличием в его структуре тиольной группы, но и с его влиянием на экспрессию белка теплового шока HSP70, регулирующего синтез глутатиона [11]. Благодаря SH-группе препарат обладает ярко выраженными восстанови-

тельными свойствами и способностью принимать от различных активных форм кислорода электроны, инактивировать свободные радикалы и сохранять уровень эндогенного глутатиона [4, 12].

Выводы

1. Установлено, что реализация нейропротективного эффекта Ангиолина связана с его позитивным влиянием на глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы.
2. Полученные результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротекции и могут быть теоретическим фундаментом для разработки новых фармакологических подходов к терапии ишемического инсульта.

1. Луцкий М. А. Окислительный стресс в патогенезе инсульта / М. А. Луцкий, Р. В. Тонких, А. П. Анибал // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2007. – Т. 107. – С. 37–42.
2. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease / M. Mari, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz // Biochimica et Biophysica Acta – 2013. – V. 1830. – P. 3317–3328.
3. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. наук. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.

4. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Е. А. Нагорна [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 512 с.
5. Патент Российской Федерации № 21370492 СО7Д, А61К 31/41 и Патент Украины № 86668 МПК 200901 А61К 31/4196 № 200705865 Лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиопротективное, противовоспалительное, антиоксидантное, противовоспалительное противопоксическое действие и обладающий низкой токсичностью / Мазур И. А., Беленичев И. Ф., Кучеренко Л. И. – Заявлено 04.06.2007. – Опул. 20.10.2009.
6. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциалных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – Киев : ГФЦ МОЗ Украины, 2010. – 81 с.
7. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика / В. С. Камышников. – Минск, 2003. – 345 с.
8. Roger L. Lundblad. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition/ L. Lundblad Roger, Fiona Macdonald. – CRC Press, 2010. – 1098 p.
9. Прохорова М. И. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. – Ленинград : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
10. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : Медиасфера, 2002. – 312 с.
11. Belenichev I. F. Disturbance of HSP70 Chaperone Activity is a possible mechanism of Mitochondrial Dysfunction / I. F. Belenichev, Yu. M. Kolesnik, N. V. Bukhtiyarova // Neurochem. Journal. – 2011. – V. 5, № 4. – P. 251–256.
12. Belenichev I. F. The Thiol-Disulfide Balance and the Nitric Oxide System in the Brain Tissue of Rats Subjected to Experimental Acute Impairment of Cerebral Blood Flow: The Therapeutic Effects of Nootropic Drugs / I. F. Belenichev, S. V. Gorbacheva, N. V. Bukhtiyarova // Neurochemical Journal. – 2014. – V. 8, № 1. – P. 24–27.

С. В. Горбачова, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова
Глутатион-залежні механізми нейропротективної дії нового метаболітотропного препарату «Ангіолін» за умов індукції нітрозуючого стресу *in vitro*

Внесення до інкубаційної нейрональної суспензії селективного інгібітора глутатион-S-трансферази – хлор-2,4-динітробензолу призводило до депривації глутатионової ланки тиол-дисульфідної системи, про що свідчить накопичення окисленого глутатиону та дефіцит відновленої форми при гальмуванні активності ферментів його метаболізму – глутатионредуктази та глутатион-S-трансферази. Це викликало неконтрольовану продукцію активних форм кисню і розвиток нітрозативного стресу, на що вказує підвищення рівня нітротирозину більше ніж у 2,2 разу в нейрональній суспензії через 60 хв після внесення ХДНБ. Вище описані патобіохімічні зміни призводили до посилення процесів клітинної загибелі в суспензії нейронів, про що свідчило підвищення кількості дегенеративно змінених нейронів у тесті з нітритом срібла. З метою фармакологічної корекції даних патологічних змін був використаний препарат «Ангіолін». Проведеними дослідженнями встановлено, що найефективнішою концентрацією препарату є 0,1 мкмоль/л. Внесення Ангіоліну в нейрональну суспензію в цій концентрації призводило до підвищення кількості клітин, що вижили, та збереження рівня відновленого глутатиону. Більш детальними біохімічними дослідженнями показано, що введення до інкубаційного середовища Ангіоліну (0,1 мкмоль/л) призводило до зменшення вираженості нітрозативного стресу, про що свідчить зниження вмісту нітротирозину, а також відновлення тиол-дисульфідної рівноваги. Ангіолін за більшістю досліджуваних параметрів достовірно перевищував ефекти препаратів порівняння – тіотриазоліну та α -ліпоевої кислоти. Реалізація нейропротективної дії Ангіоліну пов'язана з його позитивним впливом на глутатионову ланку тиол-дисульфідної системи. Препарат сприяє реактивуванню антиоксидантних ферментів і зберігає рівень ендогенного глутатиону. У результаті структура та функції нейрональних клітин залишаються збереженими. Отримані результати розкривають значення глутатионової системи нейрона як важливої мішені нейропротективної терапії при ішемічному інсульті та є експериментальним обґрунтуванням для клінічного застосування модуляторів системи глутатиону, зокрема, препарату «Ангіолін».

Ключові слова: Ангіолін, нейропротекція, тиол-дисульфідна система, глутатион, нітрозуючий стрес

С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова
Глутатион-зависимые механизмы нейропротективного действия нового метаболитотропного препарата «Ангиолин» в условиях индукции нитрозирующего стресса *in vitro*

Внесение в инкубационную нейрональную суспензию селективного ингибитора глутатион-S-трансферазы – хлор-2,4-динитробензола (CDNB) приводило к депривации глутатионового звена тиол-дисульфидной системы, о чем свидетельствует накопление окисленного глутатиона и дефи-

цит восстановленной формы при торможении активности ферментов его метаболизма – глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Это вызвало неконтролируемую продукцию активных форм кислорода и развитие нитрозативного стресса, на что указывает повышение уровня нитротирозина более чем в 2,2 раза в нейрональной суспензии через 60 мин после внесения CDNB. Выше описанные патобιοхимические изменения приводили к усилению процессов клеточной гибели в суспензии нейронов, о чем свидетельствовало увеличение количества дегенеративно измененных нейронов в тесте с нитритом серебра. С целью фармакологической коррекции данных патологических изменений был использован препарат «Ангиолин». Проведенными исследованиями установлено, что наиболее эффективной концентрацией препарата является 0,1 мкмоль/л. Внесение Ангиолина в нейрональную суспензию в этой концентрации приводило к увеличению количества выживших клеток и сохранению уровня восстановленного глутатиона. Более подробными биохимическими исследованиями показано, что введение в инкубационную среду Ангиолина (0,1 мкмоль/л) приводило к уменьшению выраженности нитрозативного стресса, о чем свидетельствует снижение содержания нитротирозина, а также восстановление тиол-дисульфидного равновесия. Ангиолин по большинству исследуемых параметров достоверно превышал эффекты препаратов сравнения – тиотриазолина и α -липоевой кислоты. Установлено, что реализация нейропротективного действия Ангиолина связана с его положительным влиянием на глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы. Препарат способствует реактивированию антиоксидантных ферментов и сохраняет уровень эндогенного глутатиона. В результате структура и функции нейрональных клеток остаются сохраненными. Полученные результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротективной терапии при ишемическом инсульте и могут быть теоретическим фундаментом для разработки новых фармакологических подходов к терапии с использованием модуляторов системы глутатиона, в частности, препарата «Ангиолин».

Ключевые слова: Ангиолин, нейропротекция, тиол-дисульфидная система, глутатион, нитрозирующий стресс

S. V. Gorbacheva, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko, N. V. Bukhtiyarova
Glutathione-dependent mechanisms of neuroprotective action of new metabolic drug «Angioline» underinduction of nitrosative stress *in vitro*

Introduction of glutathione-S-transferase – chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) selective inhibitor to the incubated neuronal suspension caused deprivation of glutathione link of thiol-disulfide system. Evidence of that is accumulation of oxidized glutathione and deficient of renovated form in case of enzymes inhibition involved in its metabolism – glutathione reductase and glutathione-S-transferase. This evoked uncontrolled reactive oxygen species production and development of nitrosative stress with an increase of nitrotyrosine level by more than 2,2 times in neuronal suspension on 60th min after CDNB introduction. These pathobiochemical changes caused the enhancement of cell death processes in neuronal suspension. That was evidenced by an increase the number of neurons with degenerative changes when testing with silver nitrite.

With the purpose of pharmacological correction of pathological changes the drug «Angioline» was used. It has been established that 0,1 μ M was the most effective drug concentration. The introduction of this Angioline concentration into the neuronal suspension caused an increase the number of survived cell and preservation of reduced glutathione level. More detailed biochemical investigation showed that Angioline administration (0,1 μ M) caused the decrease of nitrosative stress intensity. That is proved by the decrease of nitrotyrosine content and renovation of thiol-disulfide balance. Angioline according to the most of investigated parameters significantly exceeded the effects of referent drugs – thiotriazoline and -lipoic acid. It has been established that realization of Angioline neuroprotective action is connected with it positive influence on glutathione link of thiol-disulfide system. Significant antioxidant activity of the studied drug is due to the presence of thiol group in it's structure, thus it has pronounced reduction properties. The drug is able to promote reactivation of antioxidant enzymes and to maintain the level of endogenous glutathione. As the result the structure and functions of neuronal cells remain preserved.

The data obtained suggest that glutathione system of neurons is an important target for neuroprotective therapy when ischemic stroke arises and this fact may be an experimental ground for clinical application of glutathione system modulators, in particular the drug «Angioline».

Key words: Angioline, neuroprotection, thiol-disulfide system, glutathione, nitrosative stress

Надійшла: 13 липня 2015 р.

Контактна особа: Горбачова Світлана Василівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра біохімії та лабораторної діагностики, Запорізький державний медичний університет.
Електронна пошта: swg18@yandex.ua