

И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко

## Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** тиол-дисульфидная система, NR2-пептид, глутаматная эксайтотоксичность, модуляторы глутатионовой системы

Проблема острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) продолжает сохранять чрезвычайную медицинскую и социальную значимость. Несмотря на значительные достижения современной ангионеврологии, показатели летальности при ишемических нарушениях мозгового кровообращения остаются на высоком уровне [1, 2]. Вполне очевидно, что улучшить результаты лечения ОНМК и сократить число осложнений возможно путем использования фармакологических подходов, воздействующих на механизмы эндогенной нейропротекции [1]. Основным патологическим процессом в тканях мозга, развивающимся в ответ на гипоксию, являются реакции глутамат-кальциевого каскада, которые запускаются в первые минуты и часы церебральной ишемии [1–4]. Активация NMDA-рецепторов глутаматергического синапса приводит к гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) (пероксинитрита, гидроксилрадикала и супероксидрадикала) и повышению содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$ . Гиперпродукция АФК усугубляет дисбаланс в антиоксидантной системе клетки, и в частности системе глутатиона и системе антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза), что приводит к повреждению макромолекул и в конечном итоге гибели нейрона [5, 6]. В этом отношении в качестве приоритетного звена-мишени для модуляции эндогенной нейропротекции рассматривается

глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы (ТДС). Глутатион является сквенджером активных форм кислорода и азота, а также регулирует реакции утилизации свободных радикалов. Участие глутатиона восстановленного в механизмах эндогенной нейропротекции реализуется путем снижения гипервозбудимости NMDA-рецепторов и прерывания реакций глутамат-кальциевого каскада. В этом случае глутатион в концентрации 0,2–5,0 ммоль/л модулирует –SH группы NMDA [1, 2, 7]. Важность системы глутатиона в регуляции множества защитных функций клетки определяет глутатионовое звено ТДС как перспективную мишень для фармакологической коррекции в условиях церебральной ишемии [8, 9]. В предыдущем исследовании впервые были получены убедительные данные о нейропротекторном действии модуляторов глутатионовой системы в условиях экспериментальной ОНМК. Однако до конца не ясны истинные механизмы этого действия данных лекарственных средств.

*Цель исследования* – изучение нейропротекторных свойств модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима и глутаредоксина) в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

**Материалы и методы.** *Получение нейрональной культуры клеток.* Выделение обогащенных фракций нейронов и нейроглии проводили в два этапа. На первом этапе мозговую ткань дезинтегрировали с целью получения клеточной суспензии, на втором – осуществляли дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и фиколла. Для исследований *in vitro*

нейроны выделяли из коры головного мозга 10-дневных крысят линии Вистар (кора почти не содержит глиальных клеток). Для получения нейронов животных декапитировали и быстро извлекали мозг. Кору головного мозга отделяли, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7,5 % поливинилпирролидона (ПВП), 1 % бычьего сывроточного альбумина (БСА) и 10 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ . 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 % бычьим сывроточном альбумине, и центрифугировали при 60 000 g 30 мин (10 °C) в рефрижераторной центрифуге SIGMA 3-30K. Полученную таким образом клеточную суспензию разделяли на серии: интактная; контрольная, в которой индуцировали развитие глутаматной «эксайтотоксичности»; опытные, в которых индуцировали глутаматную «эксайтотоксичность» с добавлением исследуемых субстанций и препаратов в концентрации  $10^{-5}$  моль/л, и группа сравнения, в которой индуцировали глутаматную «эксайтотоксичность» с добавлением мексидола в концентрации  $10^{-5}$  моль/л [10–12].

Для моделирования глутаматной эксайтотоксичности в культуре нейронов нейробазальную среду (NBM) заменяли на NERES-солевой буфер (NBSS) и далее клетки инкубировали 60 мин в присутствии глутамата (100 мкмоль/л) при температуре 37 °C. Состав NBSS в ммоль/л: NaCl – 145, KCl – 5,  $\text{CaCl}_2$  – 1,8,  $\text{MgCl}_2$  – 1,0 (без  $\text{MgCl}_2$  в случае экспозиции клеток с глутаматом); Gly – 0,01; NERES-20; глюкоза – 5 (pH 7,4) [12]. Исследуемые вещества, в концентрации  $10^{-5}$  моль/л, добавляли за 15 мин до последующего добавления глутамата [13].

Исследования на животных проводили в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 EU. Для

изучения действия препаратов использовали селеназу Arzneimittel GmbH, Germany (раствор для инъекций, содержащий натрия селенита пентагидрат, что эквивалентно содержанию селена 50 мкг/мл), глутоксим ФАРМА-ВАМ, РФ (1 % раствор для инъекций, содержащий глутамил-цистеинил-глицин динатрия 10 мг/мл) и глутаредоксин Sigma, Aldrich (50 % глицерина, содержащий 1 ммоль/л глутатиона). В качестве референс-препарата использовали раствор мексидола ЗАО «АЛСИ Фарма», Москва (5 % раствор для инъекций содержащий этилметилгидроксипиридина сукцинат 50 мг/мл).

Нейропротекторные эффекты изучаемых препаратов оценивали по их влиянию на изменение уровней глутатиона восстановленного (GSH), нитротирозина и пептидного фрагмента NMDA-рецепторов – NR2-пептида. Содержание GSH определяли спектрофотометрически [14]. Содержание NR2-пептида и нитротирозина определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием тест-наборов «Gold Dot NR2 Peptide test», (CIS Biotech, Inc., Атланта, США) и «Nitrotyrosine ELISA Kit» («HyCult biotechnology») в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Нормальность распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова (D) и Shapiro-Wilk (W). Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Все результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где M – среднее значение, m – ошибка среднего, для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В результате нейротоксичности, вызванной высокими дозами глутамата, происходит перевозбуждение NMDA-рецепторов с последующей их деградацией на пептидные фрагменты (NR2-пептид) [15]. В контрольной нейрональной

суспензии нами был зарегистрирован значительный рост (в 5 раз) уровня NR2-пептида в сравнении с интактной суспензией. Внесение глутамата вызвало усиленную продукцию активных форм кислорода и генерацию активных дериватов оксида азота в исследуемой нейрональной суспензии, о чем свидетельствует повышение уровня маркера NO-зависимого оксидативного стресса – нитротирозина (в 2 раза). Образующийся в результате нитрозирующего стресса нейротоксичный пероксинитрит (ONOO-) взаимодействуют с SH-группами цистеиновых остатков белков и SH-группами восстановленного глутатиона, что приводит к их окислению в дисульфиды и нитрозилированию тиолов. Это истощает запасы восстановленного глутатиона, смещая ТДС-равновесие в сторону дисульфидов [1, 10, 11, 22]. Зарегистрировано снижение уровня восстановленной формы глутатиона на 65,48 % на 60 мин в сравнении с первоначальными значениями (табл.1).

Преинкубация нейрональной суспензии с модуляторами системы глутатиона способствовала ограничению гиперактивности NMDA-рецепторов (табл. 2), что выражалось в снижении уровня NR2-пептида (селеназа – на 18,8 %, глутоксим – на 19,6 %, глутаредоксин – на 68,5 %, мексидол – на 10,9 %). Следует отметить, что для селеназы, глутоксима и препарата сравнения – мексидола эти изменения не были статистически значимыми. Также зарегистрировано снижение накопления токсичного нитротирозина (селеназа – 12,5 %, глутоксим – 25 %, глутаредоксин – 49,1 %, мексидол – 17,85 %), что сви-

детельствует о некотором ограничении развития реакций нитрозирующего и оксидативного стресса (табл. 2). Ограничение оксидативного и нитрозирующего стресса, а также глутаматной эксайтотоксичности, по-нашему мнению, является следствием повышения уровня восстановленного глутатиона (повышение уровня глутатиона восстановленного: селеназа – 7,87 %, глутоксим – 25,19 %, глутаредоксин – 10,23 %, мексидол – 5,5 %) – интегрального показателя ТДС.

По нашему мнению, нейропротекторные эффекты исследуемых препаратов *in vitro* связаны с активацией редокс-чувствительных транскрипционных факторов AP-1, NF-kB, NF-1, которые приводят к увеличению экспрессии генов антиоксидантных ферментов (GPR, GR, GST, SOD, каталазы) и генов ферментов, обеспечивающих поддержание стабильной внутриклеточной концентрации GSH ( $\gamma$ -глутамилтрансферазы,  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы) за счет его синтеза *de novo* [16]. Особенною таким действием исследуемых препаратов явилось повышение уровня GSH и снижение уровня нитротирозина и NR2-пептида. Однако причина этих изменений зависела от типа препарата. В случае действия глутаредоксина изменения биохимических маркеров были обусловлены повышением активности  $\gamma$ -GCS – скорость-лимитирующего фермента синтеза GSH *de novo*, так и активности GR, восстанавливающей GSH из его окисленной формы (GSSG), что приводит к росту содержания GSH. Таким образом, рост GSH при действии глутаредоксина является результатом

Таблица 1

**Биохимические показатели в нейрональной суспензии в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* ( $M \pm m, n = 10$ )**

Показатели	Интактная суспензия	Суспензия с внесением 100 мкмоль/л глутамата (контроль)
Нитротирозин, нмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)	5,52 ± 0,65	11,2 ± 1,12*
NR2- пептид, нг/мл (на 60 мин наблюдения)	0,91 ± 0,32	5,05 ± 1,54*
Глутатион восстановленный, мкмоль/ г белка (на 60 мин наблюдения)	3,68 ± 0,19	1,27 ± 0,08*

Примечание. \* $p < 0,005$  относительно интактной суспензии.

Уровень биохимических маркеров в суспензии мозга при моделировании глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и под влиянием модуляторов тиол-дисульфидной системы ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Экспериментальная группа	Нитротирозин, нмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)	NR2-пептид, нг/мл (на 60 мин наблюдения)	Глутатион восстановленный, мкмоль/г белка (на 60 мин наблюдения)
Суспензия нейронов с добавлением глутамата (100 мкмоль/л)	11,20 ± 1,12	5,05 ± 1,54	1,27 ± 0,08
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и селеназы (10 <sup>-5</sup> моль/л)	9,80 ± 0,59	4,10 ± 0,52	1,37 ± 0,13
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и глутоксима (10 <sup>-5</sup> моль/л)	8,40 ± 0,54	4,06 ± 0,65	1,59 ± 0,1**
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и глутаредоксина (10 <sup>-5</sup> моль/л)	5,70 ± 0,48**	1,59 ± 0,31**	1,41 ± 0,09*
Суспензия нейронов с добавлением глутамата и мексидола (10 <sup>-5</sup> моль/л)	9,20 ± 0,74	4,50 ± 0,53	1,34 ± 0,06

Примечание. \* $p \leq 0,005$  по сравнению с контрольной суспензией (с добавлением глутамата); \*\* $p \leq 0,05$  по сравнению с группой мексидола.

активации синтеза GSH и его ресинтеза из GSSG вследствие повышения активности транскрипционных факторов, регулирующих гены, ответственные за повышение синтеза ферментов  $\gamma$ -GCS и GR соответственно.

Действие глутоксима, содержащего аминокислоты цистеин, глицин, глутаминовую кислоту, заключается в активации синтеза GSH *de novo*, а также подавлении активации транскрипционного фактора NF-kB [16], что приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов IL-1, TNF- $\alpha$ , вызывающих увеличение продукции АФК и развитие процессов воспаления [17, 18]. Известно, что окислительный стресс может индуцировать транспорт цистеина, глутаминовой кислоты, глицина через клеточную транспортную систему, тем самым стимулируя синтез глутатиона восстановленного в  $\gamma$ -глутамиловом цикле. Следует отметить, что глутоксим в этом случае будет являться субстратом для  $\gamma$ -GCS [19, 20].

Незначительное ограничение проявлений окислительного и нитрозирующего стресса, а также повышение

уровня GSH под действием селеназы можно отнести на счет ее способности играть роль «ловушки» свободных радикалов [21]. Таким образом, из полученных нами результатов следует, что действие глутаредоксина и глутоксима на антиоксидантный статус нейронов, подвергшихся воздействию токсических доз глутамата, сопровождается увеличением GSH и снижением нитротирозина и NR2-пептида в результате синтеза GSH *de novo* и его ресинтеза из GSSG. Напротив, селеназа в используемой дозе (10<sup>-5</sup> моль/л) вызывает рост GSH, по-видимому, благодаря способности выступать в роли «ловушки» свободных радикалов. Наибольший эффект установлен у глутаредоксина, в меньшей степени – у глутоксима, минимальный – у селеназы. Сочетание у исследуемых препаратов антиоксидантных свойств и способности активировать транскрипцию генов, в том числе и антиоксидантных ферментов, повышает устойчивость нейронов к окислительному стрессу, что свидетельствует о важном вкладе данных препаратов в нейропротекцию.

Анализ полученных результатов в нейрональной суспензии, преинкубированной с исследованными модуляторами тиол-дисульфидной системы, может служить основанием для дальнейшего изучения их нейропротекторных свойств при моделировании ОНМК у животных.

## Выводы

Таким образом, результаты проведенных опытов *in vitro* на нейрональной

суспензии показали наличие эффекта в отношении ограничения оксидативного и нитрозирующего стресса у исследованных препаратов. По выраженности действия лидировал глутаредоксин.

Экспериментальные данные указывают, что препараты селеназа, глутоксим и глутаредоксин оказывают умеренное нейропротекторное действие и могут быть использованы с целью потенцирования действия базовой нейропротекторной терапии.

1. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Е. А. Нагорная [и др.]. – Киев : Логос, 2015. – 510 с.
2. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник [и др.]. – Донецк : Издатель Заславский А. Ю., 2009. – С. 262.
3. Исайкин А. И. Патогенетические аспекты терапии ишемического инсульта/ А. И. Исайкин // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 27–30.
4. Novel Role for Glutathione S-Transferase: Regulator of Protein S-Glutathionylation Following Oxidative and Nitrosative Stress / D. M. Townsend, Y. Manevich, L. He. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, № 1. – P.436–445.
5. Гомазков О. А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга / О. А. Гомазков. – Москва : Высшая школа, 2003. – 200 с.
6. Современные представления о механизмах патогенеза повреждений мозга и нейропротекторной терапии / Ю. Г. Шанько, А. Л. Танин, А. Н. Наледько [и др.] // ARS MEDICA. – 2009. – № 3 (13). – С. 97–105.
7. Антиоксиданти: клініко-фармакологічний аспект / І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова [та ін.] // Український медичний часопис. – 2014. – № 1 (99). – С. 22–28.
8. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, В. В. Шпрах [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – Т. 1 (39). – С. 63–65.
9. Способность клеток адаптироваться к условиям низкого содержания кислорода связана с глутатионилированием Na,K-АТФазы / И. Ю. Петрушанко, О. В. Симоненко, К. М. Бурнышева [и др.] // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 175–183.
10. Горбачева С. В. Показатели тиол-дисульфидной системы и нитрозативного стресса в нейронах в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* и на фоне применения ингибиторов NOS различной селективности / С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев // Світ медицини та біології. – 2015. – № 4 (54). – С. 112–116.
11. Глутатион-зависимые механизмы нейропротективного действия нового метаболитотропного препарата «Ангиолин» в условиях индукции нитрозирующего стресса *in vitro* / С. В. Горбачева, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 6 (46). – С. 12–18.
12. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: методические рекомендации // И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев [и др.]. – Киев, 2010. – 81 с.
13. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т / В. В. Алексеев; под ред. А. И. Карпищенко. – Т. 2. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.
14. Волошина И. Н. Прогностическая значимость элевации нейроиммунных маркеров у больных с эссенциальной артериальной гипертензией и последствиями инфаркта мозга / В. А. Визир, И. Н. Волошина // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 4 (60).
15. Калинина Е. В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редоксзависимых процессах / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, А. Н. Саприн // Успехи биол. химии. – 2008. – Т. 48. – С. 319–358.
16. NOV-002, a Glutathione Disulfide Mimetic, as a Modulator of Cellular Redox Balance/ D. M. Townsend, Lin He, S. Hutchens [et al.] // Cancer Res. – 2008. – № 68 (8). – P. 2870–2877.
17. Townsend D. M. Pharmacology of a mimetic of glutathione disulfide, NOV-002 / D. M. Townsend, K. D. Tew // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2009. – V. 63, № 2. – P. 1–4
18. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом глутоксим в клетках A 431 / Е. Б. Бурова, К. П. Василенко, В. Г. Антонов, Н. Н. Никольский // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 404, № 1. – С. 1–3.
19. *Rahmanto A. S. Selenium-containing Amino Acids as Direct and Indirect Antioxidants / A. S. Rahmanto, M. J. Davies // Life. – 2012. – № 64 (11). – P. 863–871.*

20. Буй Тхи Минь Тху. Фармакологическая характеристика селеносодержащих соединений (обзор) / Буй Тхи Минь Тху // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА, Пятигорск. – 2007. – Вып. 62. – С. 448–450.
21. Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia / S. L. Mehta, S. Kumari, N. Mendeleev, P. A. Li // BMC Neuroscience. – 2012. – № 12 (3). – P. 45–50.
22. Горбачева С. В. Роль соотношения тиол- дисульфидной системы и оксида азота в механизмах выживания нейронов при церебральной ишемии: автореф. дисс. на соискание степени доктора биол. наук: спец. 14.01.32 – медицинская биохимия/ Горбачева Светлана Владимировна; ДЗ «Луганський Державний медичний університет». – Рубіжне, 2017. – 22 с.

**И. Ф. Беленичев, Е. С. Литвиненко**

### **Нейропротекторная активность модуляторов тиол-дисульфидной системы в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro***

*Цель исследования* – изучение нейропротекторных свойств модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима, глутаредоксина) в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

Эффективность модуляторов глутатионовой системы (селеназы, глутоксима, глутаредоксина) и препарата сравнения мексидола оценивали по их влиянию на уровень маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина, концентрацию пептида NR2 (продукта протеолитической деградации NMDA-рецепторов) и содержание глутатиона восстановленного в суспензии нейронов.

Введение глутамата в суспензию нейронов вызвало неконтролируемую продукцию активных форм кислорода и развитие нитрозирующего стресса с увеличением уровня нитротирозина более чем в 2,0 раза на 60-й мин после введения глутамата. Это также вызвало депривацию глутатионного звена тиол-дисульфидной системы, о чем свидетельствует дефицит эндогенного глутатиона. Перевозбуждение NMDA-рецепторов, вызванное высокими концентрациями глутамата, привело к значительному росту (в 5 раз) уровня NR2-пептида. С целью фармакологической коррекции данных патологических изменений изучаемые препараты селеназа, глутоксим, глутаредоксин вводили в концентрации  $10^{-5}$  моль/л в нейрональную суспензию. Более детальное исследование показало, что введение изучаемых препаратов вызывало снижение интенсивности нитрозирующего стресса и глутаматной эксайтотоксичности. Это подтверждается уменьшением содержания нитротирозина и NR2-пептида и восстановлением тиол-дисульфидного баланса. Установлено, что реализация нейропротекторного действия исследуемых препаратов связана с их положительным влиянием на глутатионное звено тиол-дисульфидной системы. Препараты способны поддерживать стабильный уровень эндогенного глутатиона, что по нашему мнению, связано с активацией редокс-чувствительных транскрипционных факторов AP-1, NF- $\kappa$ B, NF-1, которые приводят к экспрессии генов ферментов, ответственных за синтез GSH *de novo* и его ресинтез из GSSG. Определен наиболее эффективный препарат – глутаредоксин, который значительно превысил вышеупомянутые препараты по всем изученным показателям. Глутаредоксин также в соответствии с исследованными параметрами значительно превышал эффекты референтного препарата – мексидола.

Полученные результаты раскрывают значение глутатионовой системы нейрона как важной мишени нейропротекторной терапии при ишемическом инсульте и могут быть теоретическим фундаментом для разработки новых фармакологических подходов к терапии с использованием модуляторов системы глутатиона.

*Ключевые слова:* тиол-дисульфидная система, NR2-пептид, глутаматная эксайтотоксичность, модуляторы глутатионовой системы

**І. Ф. Беленічев, Е. С. Литвиненко**

### **Нейропротекторна активність модуляторів тіол-дисульфідної системи за умов моделювання глутаматної эксайтотоксичності *in vitro***

*Мета дослідження* – вивчення нейропротекторних властивостей модуляторів глутатионові системи (селенази, глутоксиму, глутаредоксину) за умов моделювання глутаматної эксайтотоксичності *in vitro*.

Ефективність модуляторів глутатионові системи (селенази, глутоксиму, глутаредоксину) і препарату порівняння мексидолу оцінювали за їхнім впливом на рівень маркера нітрозуючого стресу – нитротирозину, концентрацією пептиду NR2 (продукту протеолітичної деградації NMDA-рецепторів) і вмістом глутатіону відновленого в суспензії нейронів.

Введення глутамату в суспензію нейронів викликало неконтрольовану продукцію активних форм кисню та розвиток нітрозуючого стресу зі збільшенням рівня нитротирозину більше ніж у 2,0 разу на 60-й хв після введення глутамату. Це також призвело до депривації глутатионові ланки тіол-дисульфідної системи, про що свідчить дефіцит відновленої форми глутатіону. Перезбудження NMDA-рецепторів, викликане високими концентраціями глутамату, призвело до значного зростання (у 5 разів) рівня NR2-пептиду. З метою фармакологічної корекції даних патологічних змін досліджувані препарати селеназу, глутоксим, глутаредоксин вводили в концентрації  $10^{-5}$  моль/л у нейрональну

---

суспензію. Більш детальне дослідження показало, що введення досліджуваних препаратів викликало зниження інтенсивності нітрозуючого стресу та глутаматної ексайтотоксичності. Це підтверджується зменшенням вмісту нітротирозину та NR-2 пептиду, відновленням тіол-дисульфідного балансу. Встановлено, що реалізація нейропротекторної дії досліджуваних препаратів пов'язана з їхнім позитивним впливом на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи. Препарати здатні підтримувати стабільний рівень ендогенного глутатіону, що на нашу думку пов'язано з активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів AP-1, NF- $\kappa$ B, NF-1, які призводять до експресії генів ферментів, відповідальних за синтез GSH *de novo* і його ресинтез з GSSG. Визначений найефективніший препарат – глутаредоксин, який значно перевищив вищезгадані препарати за всіма вивченими показниками. Глутаредоксин також значно перевищував ефекти референтного препарату – мексидолу.

Отримані результати розкривають значення глутатіонової системи нейрона як важливої мішені нейропротекторної терапії за ішемічного інсульту та можуть бути теоретичним фундаментом для розробки нових фармакологічних підходів до терапії з використанням модуляторів системи глутатіону.

*Ключові слова:* тіол-дисульфідна система, NR2-пептид, глутаматна ексайтотоксичність, модулятори глутатіонової системи

**I. F. Belenichev, E. S. Lytvynenko**

### **Neuroprotective action of glutathione system modulators in conditions of glutamate excitotoxicity modeling *in vitro***

*The aim of the work* was to study the neuroprotective properties of glutathione system modulators (selenase, glutoxim, glutaredoxin) in neurons in conditions of glutamate excitotoxicity modeling *in vitro*.

Efficiency of glutathione system modulators (selenase, glutoxim, glutaredoxin) and comparison drug-mexidol evaluated by their influences on the marker of nitrosative stress (content of nitrotyrosine), concentration of the NR2-peptide (product of the proteolytic degradation of NMDA-receptors) and the reduced glutathione level in neuronal suspension.

Introduction of glutamate to the incubated neuronal suspension evoked uncontrolled reactive oxygen species production and development of nitrosative stress with an increase of nitrotyrosine level by more than 2,0 times in neuronal suspension on 60<sup>th</sup> min after glutamate introduction. This also caused deprivation of glutathione link of thiol-disulfide system. Evidence of that is deficient of reduced form of glutathione. Overexcitation of NMDA receptors, caused by high concentration of glutamate, led to a significant increase (5-fold) of the NR2-peptide level. With the purpose of pharmacological correction of pathological changes the selenase, glutoxim, glutaredoxin were used in concentration  $10^{-5}$  M. The introduction of this drugs into the neuronal suspension caused preservation of reduced glutathione level. More detailed investigation showed, that drug administration ( $10^{-5}$  M) caused the decrease of nitrosative stress and glutamate excitotoxicity intensity. That is proved by the decrease of nitrotyrosine and NR-2 peptide content and renovation of thiol-disulfide balance. It has been established that realization of neuroprotective action of studied drugs is connected with its positive influence on glutathione link of thiol-disulfide system. The drugs were able to maintain the level of endogenous glutathione, which in our opinion is associated with the activation of redox-sensitive transcription factors AP-1, NF- $\kappa$ B, NF-1, which lead to the expression of the enzymes genes responsible for the synthesis of GSH *de novo* and its resynthesis from GSSG. Glutaredoxin was determined as the most effective drug, which significantly exceeded the above-mentioned drugs in all studied indicators. Glutaredoxin also according to the investigated parameters significantly exceeded the effects of referent drug – mexidol.

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.

*Key words:* thiol-disulfide system, NR2-peptide, glutamate excitotoxicity, glutathione system modulator

Надійшла: 6 липня 2017 р.

---

**Контактна особа:** Беленічев І. Ф., Запорізький державний медичний університет, буд. 26, просп. Маяковського, м. Запоріжжя, 69035. Тел.: + 38 061 224 64 69.  
Електронна пошта: vitalena90@gmail.com