

## ИНГИБИРОВАНИЕ МЕКСИДОЛОМ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Ю.О.Теселкин, Б.В.Давыдов

*Клинико-биохимическая лаборатория экстренных методов исследования НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва*

---

Влияние мексидола на процесс  $Fe^{2+}$ -индуцированного ПОЛ апо-В-содержащих липопротеинов сыворотки крови изучали с помощью регистрации кинетики хемилюминесценции и определения накопления МДА в реакционной среде. Обнаружено, что мексидол дозозависимым образом уменьшал интенсивность и светосумму хемилюминесценции липопротеинов, а также накопление МДА. Высказано предположение о том, что влияние мексидола на процесс ПОЛ апо-В-содержащих липопротеинов сыворотки крови обусловлено его взаимодействием с ионами  $Fe^{2+}$ .

---

**Ключевые слова:** *кровь, окислительный стресс in vitro, липидный спектр, резистентность к окислению, мексидол*

Свободные радикалы и АФК участвуют во многих физиологических процессах в разных клетках. Высокая реакционная способность обуславливает их чрезвычайную токсичность для биологических систем [8]. В норме защита тканей и органов человека от агрессивного воздействия свободных радикалов осуществляется системой антиоксидантной защиты [12,22]. Нарушения в ее работе могут привести к неконтролируемому усилению реакций свободнорадикального окисления. Так, свободнорадикальное окисление и, в частности ПОЛ, играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, бронхолегочных и других заболеваний [4,8]. В связи с этим актуальным является создание лекарственных препаратов и биологически активных пищевых добавок, обладающих антиоксидантными свойствами, для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся развитием оксидантного стресса.

Эффективным антиоксидантным лекарственным препаратом является “Мексидол” [7]. Установлено, что при его применении в составе комплексной терапии при лечении ряда заболеваний у пациентов наблюдается снижение уровня продуктов ПОЛ в сыворотке крови по сравнению с больными, получающими стандартную терапию [3,5,16]. Основное количество липидов сыворотки крови транспортируется в составе

белок-липидных комплексов или липопротеинов (ЛП) [2]. К наиболее легко окисляемым ЛП сыворотки крови относятся ЛПНП и ЛПОНП или апо-В-содержащие ЛП (апо-В ЛП) [13]. Нельзя исключить, что взаимодействие мексидола с апо-В ЛП в условиях оксидантного стресса может играть определенную роль в их защите от ПОЛ. Однако влияние мексидола на процесс ПОЛ ЛП сыворотки крови *in vitro* не исследовалось.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния мексидола на способность ЛП сыворотки крови подвергаться ПОЛ.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали ТБК, 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол,  $\alpha$ -токоферол (“Sigma”), отечественный лекарственный препарат “Мексидол” (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат, 5% раствор). Остальные реактивы также были отечественного производства (квалификация “х.ч.” и “ос.ч.”).

Апо-В ЛП выделяли из сыворотки крови здоровых доноров методом осаждения в присутствии гепарина и  $MnCl_2$  [17]. Для этого к 1 мл сыворотки крови последовательно добавляли 0.04 мл раствора гепарина (5000 ЕД/мл) и 0.05 мл 1 М раствора  $MnCl_2$ , перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Затем образцы

центрифугировали при 1500g в течение 30 мин. Супернатант удаляли, а осадок суспензировали в 2 мл дистиллированной воды. Далее образцы центрифугировали при 5000g в течение 30 мин. Супернатант снова удаляли. Осевшие ЛП суспензировали в 1 мл фосфатного буфера (50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мМ  $\text{KCl}$  pH 7.4). Все этапы выполняли при 4°C. Содержание белка в полученных суспензиях ЛП определяли по методу Лоури [23].

ПОЛ апо-В ЛП индуцировали ионами  $\text{Fe}^{2+}$ . За ПОЛ в апо-В ЛП наблюдали, регистрируя кинетику их хемилюминесценции (ХЛ) [14]. Реакционная смесь содержала фосфатный буфер, апо-В ЛП (0.08-0.35 мг белка/мл) и 2.5 мМ сульфат железа. Измерение ХЛ проводили на хемилюминометре "ХЛМ-3М" при 37°C и постоянном перемешивании. Обработку кинетики ХЛ осуществляли с помощью специализированной компьютерной программы. В качестве основных параметров использовали максимальную интенсивность (амплитуду) свечения (I), сумму свечения (S) и время достижения максимальной интенсивности свечения (T; рис. 1).

Об уровне процесса  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного ПОЛ апо-В ЛП также судили по накоплению в реакционной среде за время T продуктов, реагирующих с ТБК, которое определяли спектрофотометрическим методом [18] и выражали в виде эквивалентного количества МДА.

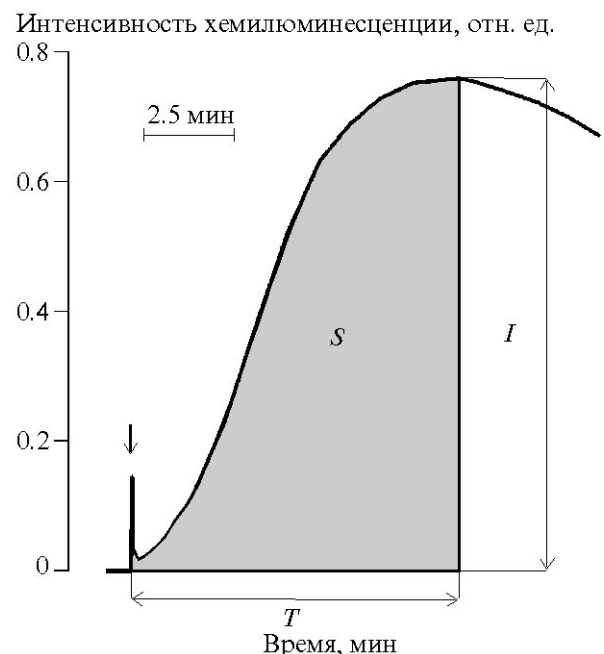
Результаты исследования обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t* критерия Стьюдента и представляли как средние величины  $\pm$  стандартная ошибка средних.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

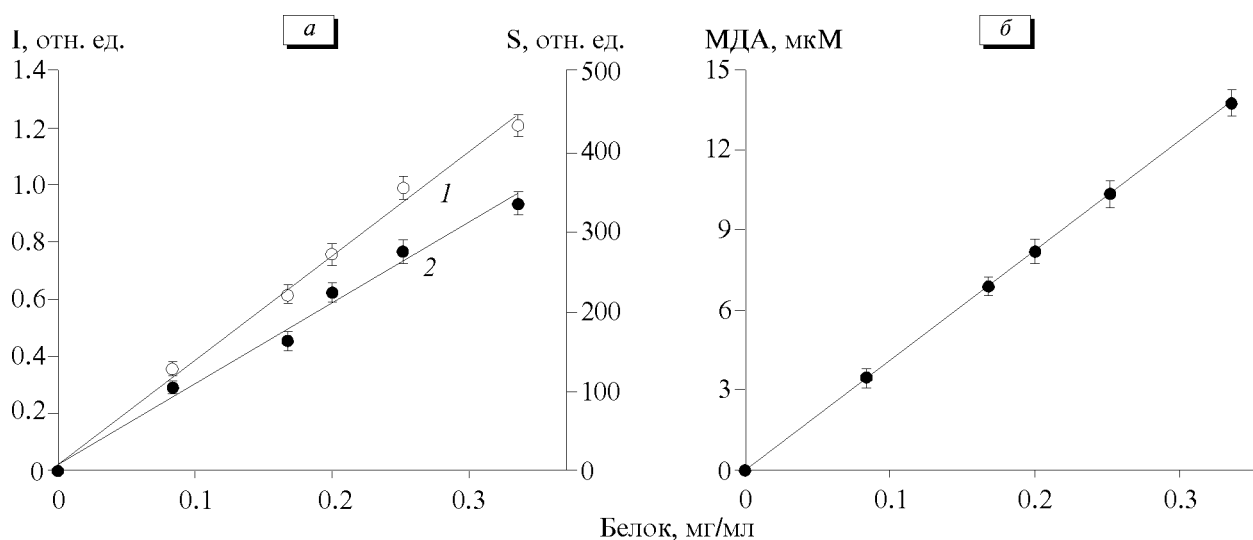
Представлена типичная кинетика  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной ХЛ апо-В ЛП сыворотки крови, которая регистрировалась при иницировании ПОЛ ЛП в фосфатной среде (рис. 1). В реакционной среде происходило накопление МДА — одного из вторичных продуктов ПОЛ, уровень накопления которого составил 8 мкМ.

С увеличением уровня содержания апо-В ЛП в реакционной среде наблюдалось прямо пропорциональное увеличение I и S (рис. 2, а), характеризующих количество образующихся возбужденных продуктов ПОЛ. Такое изменение значений I и S сопровождалось аналогичным изменением накопления в исследуемой системе МДА (рис. 2, б). Коэффициент корреляции между значениями I и МДА, S и МДА составил 0.998 ( $p < 0.001$ ). Это свидетельствует о том, что указанные параметры отражают способность апо-В ЛП подвергаться  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированному

ПОЛ, или их окисляемость. При этом одновременная регистрация  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированного свечения ЛП и накопления МДА позволяет избежать артефактов, возникающих в отдельных случаях при измерении ХЛ или продуктов ПОЛ. В исходной методике определения окисляемости апо-В ЛП [14] коэффициент корреляции между I и МДА, S и МДА составил 0.76 и 0.74 соответственно. Это, по-видимому, обусловлено тем, что авторы использовали не только другой способ осаждения апо-В ЛП — в присутствии гепарина и ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , но и не проводили отмывку полученного осадка ЛП от избытка гепарина и  $\text{Ca}^{2+}$ , а также присутствующих в супернатанте антиоксидантов сыворотки крови. В настоящее время существуют методики, которые основаны на изучении окисляемости ЛПНП сыворотки крови, выделенных с помощью ультрацентрифугирования [20]. Однако этот метод является достаточно длительным и трудоемким. Кроме того, во время его выполнения ЛПНП подвергаются дополнительному окислению. Апо-В ЛП, полученные осаждением, и ЛПНП и ЛПОНП, полученные ультрацентрифугированием, имеют одинаковые ХЛ-свойства [13], что позволяет использовать метод осаждения апо-В ЛП в качестве альтернативы методу ультрацентрифугирования



**Рис. 1.** Типичная кинетика  $\text{Fe}^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) апо-В-содержащих липопротеинов (апо-В ЛП) сыворотки крови. Апо-В ЛП — 0.2 мг белка/мл,  $\text{FeSO}_4$  — 2.5 мМ, 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мМ  $\text{KCl}$  pH 7.4. Стрелка — введение раствора  $\text{FeSO}_4$ .

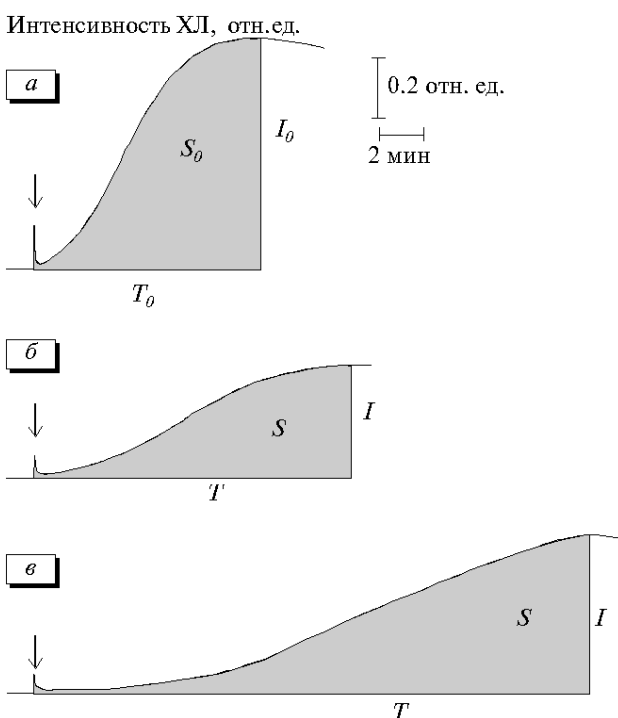


**Рис. 2.** Зависимость интенсивности и светосуммы ХЛ (а), а также накопления МДА (б) в реакционной среде от уровня содержания апо-В ЛП сыворотки крови.  
 1 — I; 2 — S. FeSO<sub>4</sub> — 2.5 мМ, 50 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 100 мМ КСl рН 7.4.

при изучении окисляемости ЛП. Так, исследована способность к Cu<sup>2+</sup>-индуцированному ПОЛ апо-В ЛП сыворотки крови больных ИБС по накоплению МДА, и обнаружено ее повы-

шение по сравнению с показателем у здоровых доноров [15].

При добавлении мексидола к суспензиям апо-В ЛП наблюдалось изменение кинетики их ХЛ (рис. 3), что проявлялось в уменьшении значений I и S. С увеличением концентрации мексидола зарегистрировано однонаправленное дозозависимое уменьшение указанных показателей, которое также совпадало со снижением накопления в реакционной среде МДА (рис. 4). Это свидетельствует о том, что в присутствии мексидола происходит ингибирование ПОЛ апо-В ЛП, индуцированного ионами Fe<sup>2+</sup>. В частности, при концентрации мексидола 3.9 мМ значения I, S и МДА уменьшились почти в 10 раз по сравнению с исходными (p<0.001).



**Рис. 3.** Влияние мексидола и α-токоферола на кинетику Fe<sup>2+</sup>-индуцированной ХЛ апо-В ЛП сыворотки крови.  
 а — контроль; б — мексидол (0.39 мМ); в — α-токоферол (0.07 мМ). I<sub>0</sub>, S<sub>0</sub>, T<sub>0</sub> — значения показателей без антиоксидантов; I, S, T — в присутствии антиоксидантов. Стрелка — момент введения раствора FeSO<sub>4</sub>.

Механизм антиоксидантного действия мексидола на Fe<sup>2+</sup>-индуцированное ПОЛ апо-В ЛП сыворотки крови до конца не ясен. Одной из важных реакций, участвующих в инициировании липидной пероксидации апо-В ЛП и образовании новых цепей окисления, является реакция взаимодействия ионов Fe<sup>2+</sup> с липидными гидропероксидами [4]:

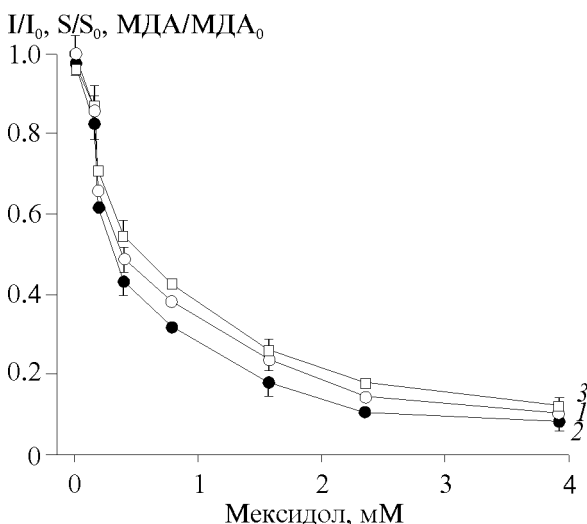


Образовавшиеся RO<sup>•</sup> вступают в реакции ПОЛ, в результате которых возникают пероксидные радикалы (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>), при участии которых образуются ROOH, а также возбужденные молекулярные продукты ПОЛ, испускающие кванты ХЛ. В связи с этим взаимодействие со свободными радикалами (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>) и ионами Fe<sup>2+</sup> можно рассматривать в качестве основных воз-

можных механизмов антиоксидантного действия мексидола в этих условиях. Поскольку образование  $RO_2^{\cdot}$  и  $RO^{\cdot}$  в процессе липидной перекисидации ЛП происходит внутри их липидной фазы, то антирадикальный механизм действия мексидола должен предполагать его пространственное расположение в этой фазе, в которой находятся такие жирорастворимые радикальные ингибиторы ПОЛ, как витамин Е, каротиноиды, коэнзим  $Q_{10}$  [20].

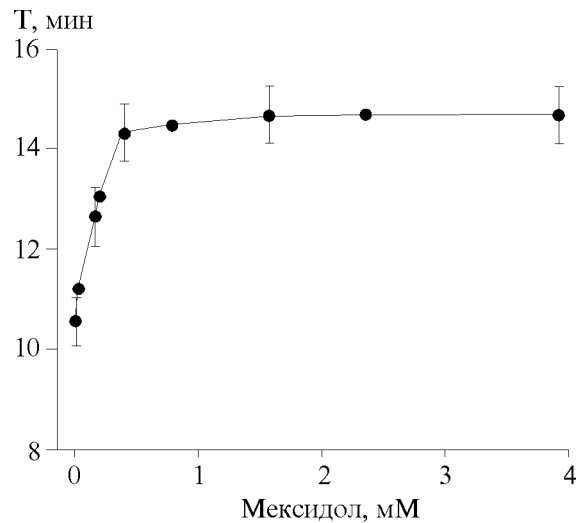
Добавление цепьобрывающих радикальных ингибиторов ( $\alpha$ -токоферола, 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола) к модельным липидным мембранам увеличивает время  $T$  кинетики  $Fe^{2+}$ -индуцированной ХЛ [1]. С повышением концентрации мексидола в суспензии апо-В ЛП значение  $T$  несколько увеличивалось, достигая максимальных значений при концентрации 0.4 мМ, и далее оставалось на постоянном уровне (рис. 5). При этом показатель  $T$  увеличивался всего в 1.4 раза по сравнению с контролем ( $p < 0.01$ ). При сопоставлении с кинетикой ХЛ апо-В ЛП сыворотки крови в присутствии  $\alpha$ -токоферола (рис. 3) видно, что при концентрации 0.07 мМ увеличение  $T$  составило 2.4 раза по сравнению с исходным значением. Перехватывание липидных радикалов, по-видимому, не является основным механизмом антиоксидантного действия мексидола.

При введении ионов  $Fe^{2+}$  в фосфатную среду часть их вовлекается в образование железофосфатного комплекса, тогда как оставшаяся часть взаимодействует с субстратом, участвуя в



**Рис. 4.** Влияние мексидола на интенсивность (1), светосумму (2)  $Fe^{2+}$ -индуцированной ХЛ апо-В ЛП сыворотки крови, а также на накопление МДА (3) в реакционной среде.

$I_0, S_0, MDA_0$  — значения показателей без мексидола;  $I, S, MDA$  — в присутствии мексидола.



**Рис. 5.** Влияние мексидола на время достижения максимальной интенсивности свечения ( $T$ )  $Fe^{2+}$ -индуцированной ХЛ апо-В ЛП сыворотки крови.

реакциях ПОЛ [6]. Добавление веществ, связывающих или окисляющих оставшиеся ионы  $Fe^{2+}$ , изменяет скорость ПОЛ. Так, показано ингибирующее влияние церулоплазмينا плазмы крови на ее  $Fe^{2+}$ -индуцированную ХЛ в фосфатном буфере [10]. Можно предположить, что при выбранных нами условиях эксперимента мексидол тоже взаимодействует с ионами  $Fe^{2+}$  или влияет на их взаимодействие с апо-В ЛП. Важность взаимодействия ионов  $Fe^{2+}$  со структурированными липидсодержащими объектами отмечалась ранее [19]. К аналогичному заключению пришли и другие авторы [9], исследовавшие влияние мексидола на  $Fe^{2+}$ -индуцированную ХЛ липосом из суммарной фракции яичных фосфолипидов, а также на ХЛ люминола, индуцированную системой гемоглобин—пероксид водорода, или водорастворимыми  $RO_2^{\cdot}$ , образующимися при термогидролизе 2,2'-азобис(2-метилпропионамидина) дигидрохлорида. Мексидол не перехватывал липидные радикалы, водорастворимые  $RO_2^{\cdot}$ , а также радикалы феррилгемоглобина, но взаимодействовал с ионами  $Fe^{2+}$  и радикалами люминола.

Таким образом, мексидол ингибирует процесс ПОЛ апо-В ЛП сыворотки крови, индуцированный ионами  $Fe^{2+}$ . Механизм ингибирования липидной перекисидации апо-В ЛП мексидолом обусловлен его влиянием на состояние ионов  $Fe^{2+}$  и/или эффективность их взаимодействия с ЛП. Установлено, что тканевое повреждение сопровождается освобождением из внутриклеточных депо ионов железа, способных индуцировать свободнорадикальные реакции [11]. При некоторых патологических состояниях

организма человека отмечено появление в плазме крови железа, входящего в состав низкомолекулярных комплексов, которые при определенных условиях тоже инициируют ПОЛ [21,22]. В связи с этим обнаруженный антиоксидантный эффект мексидола может являться важным звеном в общем механизме его антиоксидантного действия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Ребров Л.Б. и др.* // Биомед. технол. и радиоэлектрон. 2003. № 6. С. 37-43.
2. *Белова Л.А., Оглоблина О.Г., Белов А.А., Кухарчук В.В.* // Вопр. мед. хим. 2000. Т. 46, № 1. С. 8-21.
3. *Васильев И.Т., Мумладзе Р.Б., Чудных С.М. и др.* // Анн. хир. 2004. № 4. С. 33-38.
4. *Владимиров Ю.А.* // Вестн. РАМН. 1998. № 7. С. 43-51.
5. *Голиков А.П., Голиков П.П., Давыдов Б.В. и др.* // Кардиология. 2002. Т. 42, № 3. С. 25-29.
6. *Дремина Е.С., Шаров В.С.* // Биофизика. 1995. Т. 40, Вып. 2. С. 335-341.
7. *Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д.* Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. М., 1995.
8. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001.
9. *Клебанов Г.И., Любицкий О.Б., Васильева О.В. и др.* // Вопр. мед. хим. 2001. Т. 47, № 3. С. 288-300.
10. *Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Владимиров Ю.А.* // Биофизика. 1988. Т. 33, Вып. 3. С. 512-516.
11. *Козлов А.В., Шинкаренко Л.И., Владимиров Ю.А., Азизова О.А.* // Бюл. экспер. биол. 1985. Т. 99, № 1. С. 38-40.
12. *Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.* // Кардиология. 2000. Т. 40, № 7. С. 48-61.
13. *Лопухин Ю.М., Владимиров Ю.А., Молоденков М.Н. и др.* // Вопр. мед. хим. 1983. Т. 29, № 1. С.116-120.
14. *Лопухин Ю.М., Владимиров Ю.А., Молоденков М.Н. и др.* // Бюл. экспер. биол. 1983. Т. 95, № 2. С. 61-63.
15. *Рагино Ю.И., Душкин М.И.* // Клин. лаб. диагност. 1998. № 3. С. 6-8.
16. *Смирнов С.В., Голиков П.П., Матвеев С.Б. и др.* // Вестн. интенс. тер. 2002. № 1. С. 23-25.
17. *Albers J.J., Warnick G.R., Chenng M.C.* // Lipids. 1978. Vol. 13, N 12. P. 926-932.
18. *Asakawa T., Matsushita S.* // Ibid. 1980. Vol. 15, N 3. P. 137-140.
19. *Driomina E.S., Sharov V.S., Vladimirov Yu.A.* // Free Radic. Biol. Med. 1993. Vol. 15, N 3. P. 239-247.
20. *Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M. et al.* // Ann. Med. 1991. Vol. 23, N 5. P. 573-581.
21. *Gutteridge J.M.C.* // Med. Biol. 1984. Vol. 64, N 2. P. 101-104.
22. *Gutteridge J.M.C., Mitchell J.* // Br. Med. Bull. 1999. Vol. 55, N 1. P. 49-75.
23. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randell R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 263-275.