

МЕКОНОВАЯ КИСЛОТА – ВОЗМОЖНЫЙ НЕЙРОПРОТЕКТОР: ОБОСНОВАНИЕ НА ЭКСПЕРИМЕНТАХ *in vitro* И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ

© 2023 г. С.В. Козин*, **, Л.И. Ивашенко*, А.А. Кравцов*, **, Л.В. Васильева*,
А.М. Васильев*, Н.Н. Буков*, А.А. Дорохова*, **, #, О.М. Лясота*, **,
А.В. Беспалов*, С.С. Джимаков*, **

*Кубанский государственный университет, Ставропольская ул., 149, Краснодар, 350040, Россия

**ФИЦ «Южный научный центр РАН», пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону, 344006, Россия

#E-mail: 013194@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2022 г.

После доработки 23.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

Основными представителями гамма-пириновых кислот являются меконовая, коменовая, хелидоновая и койевая кислоты. В отношении коеновой кислоты обнаружен нейропротекторный эффект, а хелидоновая кислота обладает выраженным противовоспалительным действием. В отношении меконовой кислоты нейропротекторное действие не было изучено. Целью настоящей работы было установление нейропротекторного потенциала меконовой кислоты на модели ишемического инсульта *in vitro*, в том числе и исходя из ее физико-химических свойств. Первичную нейро-глиальную культуру получали из мозжечка семи-восьмисуточных крысят линии Wistar методом механической-диссоциации. Защитное действие меконовой кислоты на культуру нейронов мозжечка изучали на модели глутаматной токсичности и кислородо-глюкозной депривации. Антиоксидантную активность меконовой кислоты изучали квантово-механическими расчетами и экспериментально в модельной системе «цитрат–фосфат–люминол» методом хемилюминесцентного анализа. Хелатирующие свойства меконовой кислоты по отношению к Fe^{3+} в растворах изучены Job's-методом. Было установлено, что меконовая кислота оказывает защитный эффект на моделях ишемии *in vitro*. Ее действие приводит к снижению уровня внутриклеточного кальция и восстановлению мембранного потенциала митохондрий в культуре нейронов мозжечка при глутаматном воздействии, и увеличению процента живых клеток при кислородо-глюкозной депривации. Меконовая кислота имеет высокий расчетный антиоксидантный потенциал, подтвержденный экспериментально. При повышении pH среды происходит ступенчатое связывание меконовой кислоты с Fe^{3+} с образованием комплексов разного соотношения лиганд/металл. При физиологических значениях pH полученный комплекс имеет состав 1:3. Выявленное антиоксидантное, хелатирующее и цитопротекторное действие меконовой кислоты дает основание для дальнейшего изучения возможных нейропротекторных свойств данного соединения в экспериментах *in vivo*, а полученные в работе данные о ее физико-химических свойствах могут быть полезны для синтеза и изучения новых координационных соединений на основе меконовой кислоты.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, меконовая кислота, культура нейронов мозжечка, глутаматная токсичность, кислородо-глюкозная депривация, нейропротекция, комплексы железа.

DOI: 10.31857/S0006302923010039, EDN: NYXBTR

Меконовая кислота (МК, 3-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота) является представителем класса гамма-пириновых соединений, входит в состав опия снотворного мака *Papaver somniferum*. С точки зрения фармакологии МК интересна тем, что является представителем

семейства γ -пириновых кислот, в отношении которых установлено терапевтическое действие. Так, например, коеновая кислота (5-гидрокси-4-оксо-4Н-пиран-2-карбоновая кислота), входящая в состав лекарственного препарата «Бализ-2», способствует ускорению сроков заживления язв двенадцатиперстной кишки. На модели сквозной неинфицированной раны у кроликов было установлено, что коеновая кислота приво-

Сокращения: МК – меконовая кислота, ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

дила к уменьшению сроков закрытия раны. Коменовая кислота способствует снижению сроков заживления ожоговых ран и отторжению некроза, не оставляя на теле грубых рубцов. Фармакологическое средство «Бализ-2» на основе коменовой кислоты хорошо зарекомендовало себя в клинической практике и успешно применялось в ходе военных действий, а также на борту космической станции «Союз» [1]. Установлено, что коменовая кислота оказывает антигипоксическое и нейропротекторное действие у крыс на модели гипоксического воздействия и острого иммобилизационного стресса [2, 3] и оказывает протекторное действие на культуру нейронов мозжечка при глутаматном воздействии, снижая гибель нейрональных клеток и уменьшая уровень ионов кальция внутри клеток [4]. Она положительно влияет на рост спинальных ганглиев при действии окислительного стресса [5], а также восстанавливает амплитуду длительной потенциации переживающих срезов гиппокампа у стрессированных животных [6]. Еще один представитель семейства 4Н-пирановых кислот – хелидоновая кислота (4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота), входит в состав лекарственного растения *Chelidonium majus* L. и оказывает противовоспалительное действие при моделировании у животных язвенного колита и аллергического ринита [7, 8]. В отношении МК известно, что она, также как и коменовая кислота, снижает частоту повторных ответов ноцицептивных нейронов [9] и входит в состав неопиоидного анальгетика «Аноцептин» [10].

С точки зрения химии молекула МК интересна тем, что выступает потенциальным донорным биолигандом для ряда жестких и умеренно жестких кислот Льюиса из *d*- и *f*-металлов [11], это дает основание для изучения координационных свойств МК с ионами биометаллов.

Цереброваскулярные и нейродегенеративные заболевания являются самыми распространенными неврологическими расстройствами и занимают второе место по смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний. Последствия данных заболеваний опасны высоким уровнем инвалидизации всех слоев населения, включая и трудоспособное. Основной стратегией лечения является фармакологическая коррекция, направленная на устранение ключевых патологических звеньев, развивающихся в поврежденных отделах головного мозга. Одним из таких звеньев является окислительный стресс. В головном мозге есть необходимые предпосылки для развития свободнорадикальных процессов, особенно при гипоксических условиях. Например, таковыми являются наличие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот, очень низкая активность каталазы и глутатионпероксидазы, высокое содержание ионов двухвалентного железа и

малое количество витамина А [12]. Гиперпродукция активных форм кислорода и азота, а также развитие процессов перекисного окисления липидов приводят к нарушению гематоэнцефалического барьера, развитию воспалительного процесса, апоптотической и некротической гибели нейронов. Поэтому для снижения последствий инсульта и нейродегенеративных процессов была предложена антиоксидантная терапия. Антиоксиданты подразделяются на прямые и косвенные. Первые осуществляют захват радикалов за счет особенностей структурного строения, эффект вторых достигается активацией первичных и вторичных мессенджеров клетки, ведущих к увеличению экспрессии ряда низкомолекулярных белков и ферментов антиоксидантной защиты. В процессе старения происходит нарушение гомеостаза металлов переменной валентности, таких как медь и железо, что приводит к их накоплению в тканях головного мозга [13]. У пациентов, страдающих нейродегенеративными расстройствами, обнаруживается избыточная концентрация ионов железа в соответствующих областях головного мозга. При болезни Альцгеймера происходит активное накопление ионов железа в амилоидных бляшках и нейрофибриллярных клубках и вокруг них [14]. При паркинсонизме накопление ионов железа происходит в черной субстанции и тельцах Леви [15]. Усиление агрегации β -амилоидного белка и α -синуклеина, а также отягощение окислительного стресса на фоне накопления железа приводит к прогрессированию данных заболеваний. Большое количество ионов железа может резко высвободиться в поврежденных областях мозга после местного кровоизлияния, вызванного травмой или эпизодов инсульта различной этиологии [16]. На основании этих данных хелатотерапия металлов рассматривается как перспективное направление в нейропротекции, но в связи с высокой токсичностью многие хелатирующие агенты не нашли клинического применения [17, 18].

Еще одним патологическим звеном при нейродегенерации является эксайтотоксичность. Поэтому наряду с антиоксидантами используют лекарственные препараты, действие которых направлено на уменьшение токсического действия глутамата. К таким веществам относят антагонисты глутаматных рецепторов, блокаторы кальциевых каналов, а также агонисты рецепторов гамма-аминомасляной кислоты [19].

Современная нейрофармакология использует стратегию полипрагазии, использующую одновременно несколько препаратов, действующих на разные звенья патологического процесса [20]. Применение нескольких препаратов создают некоторые проблемы: во-первых, из-за большой токсической нагрузки на организм пациента, во-вторых, необходимо учитывать взаимное влия-

ния веществ друг на друга в условиях организма. Несмотря на большое количество известных молекул с нейропротекторной активностью, многие из них не проходят стадии клинического испытания [19, 21]. Поэтому вопрос поиска эффективных и безопасных нейропротекторов, обладающих одновременно несколькими терапевтическими свойствами, является актуальной задачей. В литературе отсутствуют сведения о комплексообразующих свойствах МК с ионами железа. Ранее было сказано, что родственные меконовой кислоте комоновая и хелидоновая кислоты обладают высокой биологической активностью, в том числе антиоксидантной и противовоспалительной. В исследовании, проведенном нами ранее, было установлено, что МК ингибировала развитие реакции свободнорадикального окисления липидов желтка и повышала выживаемость нейронов мозжечка при глутаматном воздействии [22]. Целью настоящей работы было исследование нейропротекторного потенциала меконовой кислоты на моделях ишемического инсульта *in vitro*, а именно, оценить уровень внутриклеточного кальция и мембранный потенциал митохондрий нейронов мозжечка при глутаматной токсичности, исследовать ее защитный эффект при кислород-глюкозной депривации, а также дальнейшее исследование антиоксидантных свойств МК исходя из ее физико-химических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Меконовая кислота была получена в отделе биологически активных веществ Кубанского государственного университета из койевой кислоты по методике, подробно описанной немецкими исследователями [23]. Чистоту полученного соединения контролировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Сорбфил-А», элюент – изопропанол, растворитель – диметилсульфоксид, проявитель – пары йода, щелочной раствор KMnO_4 . Качественный фазовый состав устанавливали рентгенодифрактометрическим методом на приборе XRD-7000 (Shimadzu, Япония). Идентификацию пиков на дифрактограммах и количественное содержание фаз проводили с помощью программного комплекса PDWin 2.0 и пакета Crystallographica Search-Match, интегрированных в программно-аппаратный комплекс прибора. Инфракрасные спектры записывали на ИК-Фурье-спектрометре VERTEX 70 (Bruker, Германия). Электронные спектры фиксировали на двулучевом спектрофотометре U-2900 (Hitachi, Япония).

Электронные спектры поглощения меконовой кислоты и комплексных соединений, образующихся в растворе при сливании растворов FeCl_3 и

меконовой кислоты (молярное соотношение 1:5) изучали в условиях различной кислотности среды ($\text{pH} = 1-10$). Регулирование pH среды осуществляли концентрированными растворами гидроксида калия и хлорной кислоты, поскольку анион хлорной кислоты (ClO_4^-) не склонен к образованию комплексов с катионами Fe^{3+} . Ионную силу во всех экспериментах поддерживали 0.1 М раствором хлорида калия.

Определение состава комплексов осуществляли методом изомолярных серий (метод Остромысленского–Жоба) [24]. Для этого готовили три серии растворов смеси трехвалентного железа и меконовой кислоты в антибатных соотношениях от 1:9 до 9:1, сохраняя постоянным общий объем раствора в каждом опыте ($\text{pH} 3.0, 5.0$ и 7.5). Необходимое значение кислотности задавали раствором HCl/KCl для $\text{pH} 3.0$ и ацетатным буфером для $\text{pH} 5.0$; физиологическое значение $\text{pH} 7.4$ поддерживали HEPES -буфером. Используя полученные кривые «состав–свойство», определяли ступенчатые константы нестойкости образующихся комплексных соединений. Так, путем линейной экстраполяции начальных участков каждой кривой до точки пересечения определяли оптическую плотность A_0 , соответствующую комплексу при полном отсутствии диссоциации, и далее рассчитывали ступенчатую константу нестойкости по формуле $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$, где C – концентрация несвязанного в комплекс лиганда; α – степень диссоциации комплекса, которую рассчитывали по формуле $\alpha = (A_0 - A_1) / A_0$ где A_1 – оптическая плотность, соответствующая максимуму кривой изомолярной серии (экспериментальное значение).

Полученные константы нестойкости дополнительно уточняли методом кажущегося отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера (метод Бабко) [24].

Антиоксидантную активность МК изучали методом хемилюминесцентного анализа на приборе Lum-100 (Россия) в модельной системе – «цитрат–фосфат–люминол» [25]. Веществом сравнения служил антиоксидант – этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС). Модельная система «цитрат–фосфат–люминол» состоит из цитрата натрия (4 мМ), фосфатного буфера (105 мМ KCl , 20 мМ KH_2PO_4) и люминола (10 мМ). Инициацию свечения проводили добавлением 35 мМ Fe^{2+} в форме сульфата железа. Регистрацию вели пять минут. Антиоксидантный статус исследуемого вещества оценивали по интенсивности свечения (площадь под спектраль-

ной кривой) в усл. ед., а также по тангенсу угла наклона восходящего участка графика.

Квантово-химическое исследование осуществляли в программном пакете ORCA 5.0.1 [26]. Оптимизацию геометрии нейтральных молекул, анионов и радикалов, а также расчет термодинамических параметров осуществляли в рамках теории DFT с помощью хорошо известного гибридного функционала B3LYP [27] с дисперсионной поправкой D3BJ [28] в валентно-расщепленном базисном наборе def2-TZVPD [29]. Все найденные геометрии подтверждались отсутствием мнимых колебательных частот. Все расчеты проводили с учетом неспецифической сольватации в рамках модели CPCM (растворитель – вода) [30]. Для генерации Input-файлов применяли программу Gabedit 2.5. Для визуализации молекулярной геометрии и колебательных частот использовали программу ChemCraft 1.8.

Первичную нейроглиальную культуру получали из мозжечка 7–8-суточных крысят линии Wistar методом ферментно-механической диссоциации, с последующей недельной инкубацией в питательной среде, состоящей из фетальной телячьей сыворотки (10%) и среды Игла (90%) [31]. Для определения доли живых клеток использовали ручной подсчет, для этого культивированные клетки фиксировали смесью «этанол–формальдегид–уксусная кислота» (7:2:1) с последующим окрашиванием трипановым синим. Кислородно-глюкозную депривацию моделировали, заменяя на 45 мин культуральную среду на солевой раствор (состав (в мм): NaCl – 154, KCl – 25, CaCl₂ – 2.3, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 3.6, Na₂HPO₄ – 0.35, HEPES – 10) и помещая культуры в аргоновую атмосферу вместе с безглюкозным солевым раствором [32]. Через 45 мин культуры промывали и возвращали в солевой раствор с глюкозой и МК в исследуемых концентрациях 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ; через сутки промывали от вещества и проводили фиксацию с последующим окрашиванием. Результат пересчитывали в процентах от контроля.

Эксайтотоксичность моделировали добавлением глутамата (Sigma, США) концентрацией 50 мкМ на 10 мин в солевом растворе следующего состава (в мМ): NaCl – 154, KCl – 25, CaCl₂ – 2.3, NaHCO₃ – 3.6, Na₂HPO₄ – 0.35, HEPES – 5, глюкоза – 5.6. Затем культуры возвращали в исходную питательную среду. В часть лунок добавляли МК в концентрации 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ. Уровень кальция после действия глутамата определяли с использованием флуоресцентного зонда Fluo4-AM (ThermoFisher Scientific, США), кото-

рый добавляли к культурам перед воздействием глутамата на 30 мин. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии 535 нм. Результаты представлены в процентах, за 100% принят уровень флуоресценции контрольных культур, не подвергавшихся воздействию глутамата и меконовой кислоты. Мембранный потенциал митохондрий после глутаматного воздействия определяли с использованием флуоресцентного зонда тетраметилродамина (ThermoFisher Scientific, США), который добавляли к культурам перед воздействием глутамата на 30 мин. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 535 нм, эмиссии 595 нм. Результаты представлены в процентах, за 100% принят уровень флуоресценции контрольных культур, не подвергавшихся воздействию глутамата и меконовой кислоты.

Все измерения с использованием зондов проводили на многофункциональном ридере для микропланшетов FilterMax F5 (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью STATISTICA 10. Достоверность различий средних значений (M), найденных между группами, статистически оценивали с помощью непараметрического U -критерия (Манна–Уитни), различие считали достоверным для $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученное соединение характеризуется рядом специфических полос в инфракрасном спектре, характерных для меконовой кислоты и указанных в работе [23]: 3508, 3362, 3092, 1752, 1676, 1622, 1269, 1232, 1196, 1053, 906, 783, 667 см⁻¹.

Согласно данным рентгенофазового анализа исследуемый образец имеет кристаллическую структуру (рис. 1а) и характеризуется определенным набором значений 2θ , межплоскостных расстояний d_{hkl} и относительных интенсивностей I (%), которые сравнивали с табличными значениями эталонных дифрактограмм однофазных веществ, представленных в базе данных ICDD-PDF-2. Исследуемый образец идентифицируется как гидрат меконовой кислоты с брутто-формулой C₇H₄O₇ · 3H₂O орторомбической кристаллической системы (код ссылки: 00-024-1653) (рис. 1б).

Для определения области существования различных форм комплексных соединений, во-первых, изучено спектральное поведение меконовой кислоты при различных рН среды. Из рис. 2 видно, что спектр поглощения меконовой кислоты при повышении рН среды от 3 до 10 не испытыва-

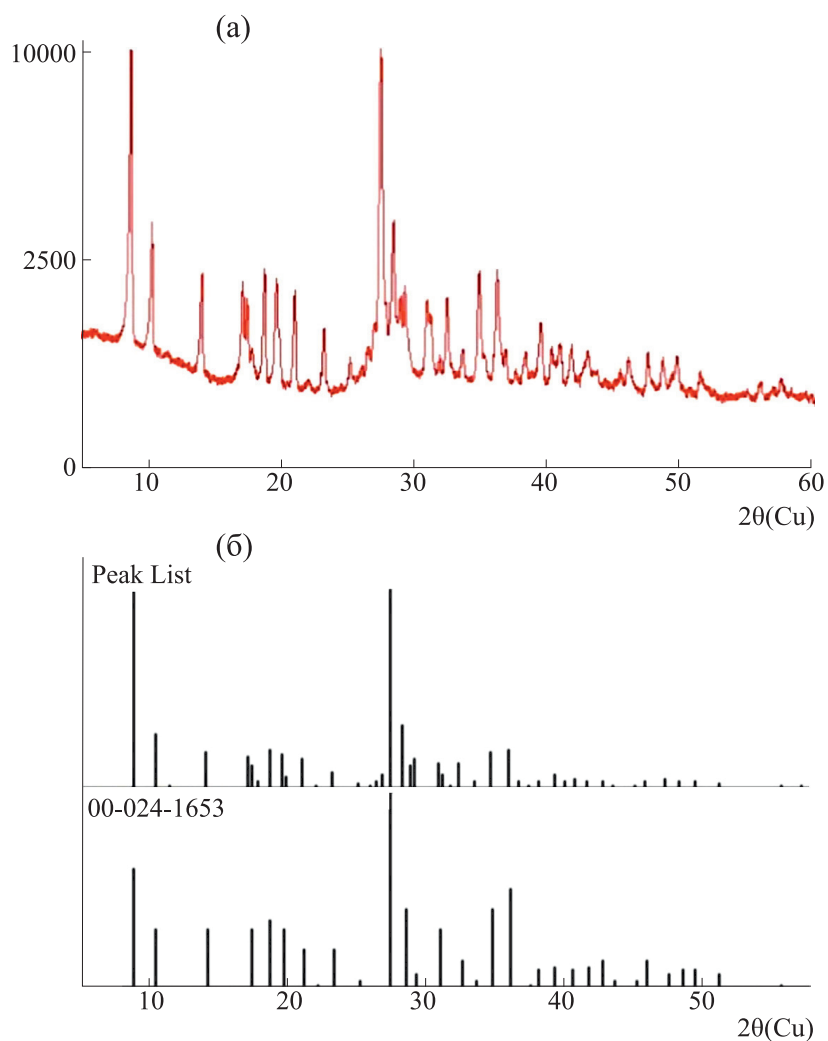


Рис. 1. (а) – Диффрактограмма исследуемого образца, (б) – штрих-диаграммы исследуемого и эталонного образца.

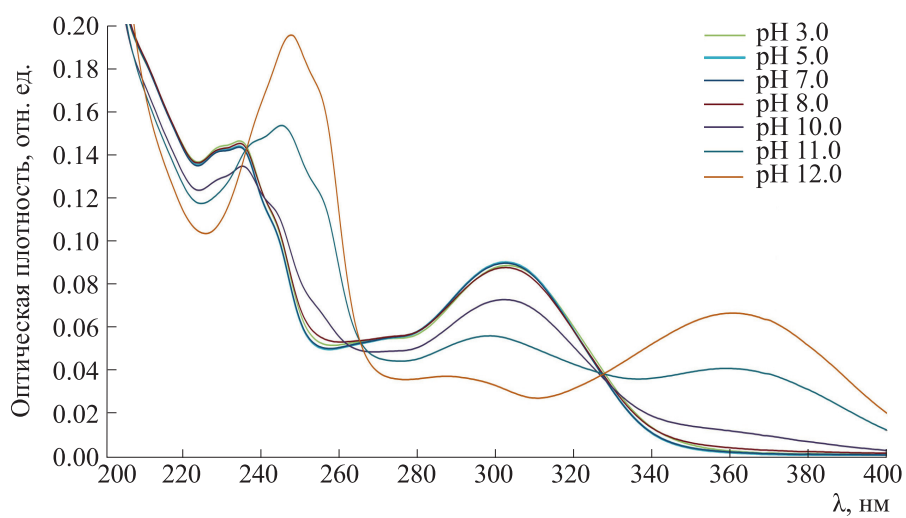


Рис. 2. Электронные спектры водных растворов меконовой кислоты при различных pH.

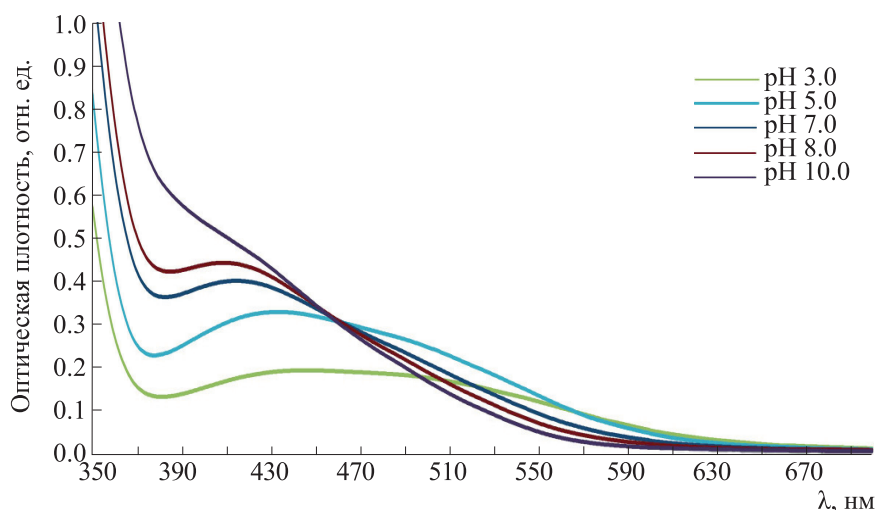


Рис. 3. Электронные спектры водных растворов FeCl_3 ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) и меконовой кислоты (мольное соотношение 1 : 5).

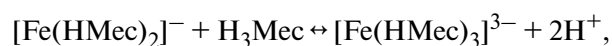
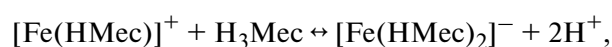
ет заметных изменений и обладает двумя характерными максимумами: $\lambda_1 = 233$ нм и $\lambda_2 = 303$ нм. При pH свыше 10 происходит депротонирование OH-группы, которое приводит к батохромному сдвигу максимумов полос поглощения, отвечающей за переход $\pi \rightarrow \pi$, в результате чего максимум поглощения смещается к 247 и 360 нм. Во-вторых, записаны электронные спектры поглощения комплексных соединений, образующихся в растворе при сливании растворов FeCl_3 и меконовой кислоты (молярное соотношение 1 : 5) в условиях различной кислотности среды (pH = 1 ÷ 10).

Из рис. 3 видно, что максимумы полос поглощения различных форм комплексов лежат в области 380–600 нм, а изобестическая точка расположена при 460 нм. В качестве аналитической длины волны для метода изомолярных серий и метода Бабко использовали длину волны 420 нм (средняя величина, при которой каждая из форм комплексов имеет поглощение в электронном спектре).

Из рис. 4а видно, что первая и вторая константа диссоциации меконовой кислоты составляют 2.0 и 2.5 и соответствуют депротонированию двух карбоксильных групп, третья константа находится в щелочной области и равна 9.7 и обусловлена диссоциацией гидроксильной группы. Таким образом, при значениях pH, близких к физиологическим, меконовая кислота находится в дважды депротонированной форме (~ 99%). С использованием диаграмм изомолярных серий были получены константы нестойкости и полные константы устойчивости вышеуказанных комплексов при трех значениях pH. При pH 3.0 получен комплекс с соотношением лиганд/металл 1 : 1 с $K_1 = 1.20 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $\lg \beta k_1 = 4.85$. При pH 5.0 полу-

чен комплекс с соотношением лиганд/металл 1 : 2 с $K_2 = 1.07 \cdot 10^{-6}$ моль/л и $\lg \beta k_2 = 5.93$. При физиологическом значении pH раствора состав комплекса 1 : 3 с $K_3 = 1.21 \cdot 10^{-11}$ моль/л и $\lg \beta k_3 = 10.86$.

Методом Бабко были получены близкие значения констант. Для комплекса составом 1 : 1 при разбавлении в два и пять раз получены $K_1 = 1.58 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lg \beta k_1 = 4.80$, $K_1^* = 1.48 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lg \beta k_1^* = 4.83$. При разбавлении в два раза для комплекса 1 : 2 значения констант следующие: $K_2 = 1.26 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $\lg \beta k_2 = 5.90$, а при разбавлении в пять раз комплекса данного состава получили $K_2^* = 1.20 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $\lg \beta k_2^* = 5.92$. При соотношении лиганд/металл, равном 1 : 3, $K_3 = 1.35 \cdot 10^{-11}$ моль/л, $\lg \beta k_3 = 10.87$ (при разбавлении в два раза) и $K_3^* = 1.55 \cdot 10^{-11}$ моль/л, $\lg \beta k_3^* = 10.81$ (при разбавлении в пять раз). На основании величин констант устойчивости, полученных на основании двух экспериментальных методов, была построена диаграмма распределения различных форм комплексов от pH раствора. Из нее видно, что при физиологическом значении pH преобладает комплекс состава 1 : 3 (~97%), на долю комплекса составом 1 : 2 приходится ~3%. Таким образом, при повышении pH среды происходит ступенчатое образование комплексов по следующей схеме:



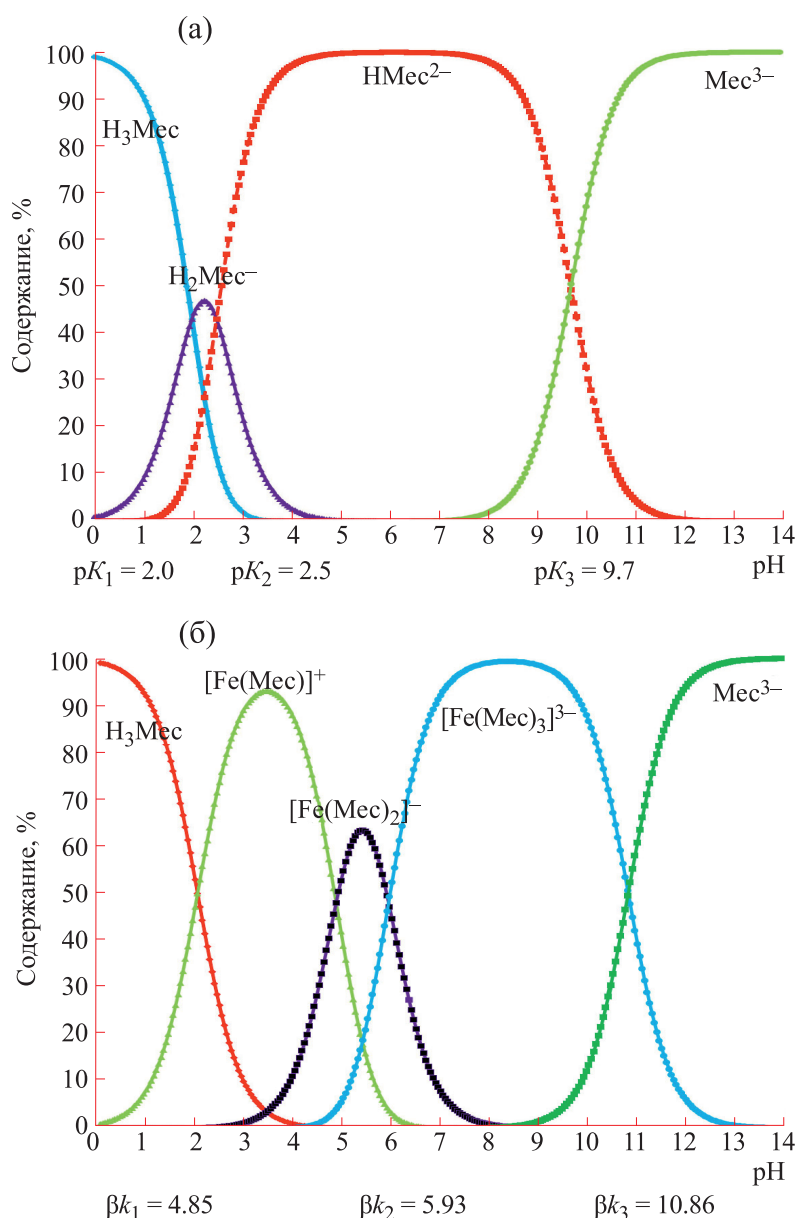
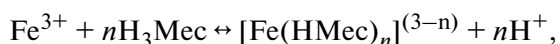


Рис. 4. (а) – Диаграмма зависимости распределения ионных форм меконовой кислоты от рН; (б) – диаграмма распределения различных форм комплекса Fe^{3+} с меконовой кислотой в зависимости от рН.



где H_3Mec – молекула меконовой кислоты, $[\text{Fe}(\text{HMec})]^+$ – комплекс состава 1 : 1, $[\text{Fe}(\text{HMec})_2]^-$ – комплекс состава 1:2, $[\text{Fe}(\text{HMec})_3]^{3-}$ – комплекс состава 1 : 3.

Согласно расчетным данным, меконвая кислота обладает наименьшим значением энтальпии одноэлектронного переноса в трианионной форме и составляет 318.7 кДж/моль, тогда как для дианионной формы данное значение равно 421.3 кДж/моль. Для нейтральной молекулы ЭМГПС данный показатель составляет

472.4 кДж/моль, тогда как для анионной формы – 322.3 кДж/моль.

В модельной системе «цитрат–фосфат–люминол» МК проявила дозозависимое снижение интенсивности свечения и уменьшение тангенса наклона восходящего графика хемилюминесцентной реакции (табл. 1). При концентрации 0.2 мМ МК уменьшает хемилюминесценцию на 73% против 48% в случае ЭМГПС. Снижение интегрального показателя свечения при концентрациях антиоксидантов 0.3 и 0.6 мМ составило 80 и 87% у МК против 55 и 73% у ЭМГПС ($p < 0.05$). Меконвая кислота также, как и вещество срав-

Таблица 1. Показатели хемилюминесцентной реакции в модельной системе «цитрат–фосфат–люминол»

Концентрация, мМ	Интенсивность свечения, усл. ед.		$\text{tg}\alpha \cdot 10^{-4}$	
	МК	ЭМГПС	МК	ЭМГПС
0	141.0 ± 1.9	141.0 ± 1.9	360 ± 9	360 ± 9
0.2	$38.0 \pm 0.8^{*\#}$	$73.0 \pm 3.2^*$	$90 \pm 3^{*\#}$	$190 \pm 3^*$
0.3	$28.0 \pm 0.5^{*\#}$	$64.0 \pm 1.4^*$	$56 \pm 3^{*\#}$	$160 \pm 6^*$
0.6	$16.0 \pm 0.6^{*\#}$	$38.0 \pm 1.1^*$	$24 \pm 4^{*\#}$	$100 \pm 6^*$

Примечание. МК – меконовая кислота, ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат, * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # – $p < 0.05$ по сравнению с ЭМГПС.

нения этилметилгидроксипиридина сукцинат ингибировали образование аминокислоты (конечного продукта окисления люминола). Данные этого эксперимента хорошо согласуются с результатами раннее проведенного нами исследования. В работе [22] показано, что МК и ЭМГПС оказывали дозозависимое снижение интенсивности развития свободнорадикальной реакции окисления липидов желтка в модельной системе желточных-липопротеинов. Полученные экспериментальные данные в двух модельных системах и расчетные данные указывают на высокий антиоксидантный потенциал МК.

Ранее было показано [22], что добавление МК в культуры нейронов мозжечка, не подвергшихся воздействию, во всех исследуемых концентрациях не влияла на жизнеспособность клеток, поэтому действие МК на выживаемость клеток оцени-

вали только после воздействия – кислородо-глюкозной депривации. Из рис. 5 видно, что при действии кислородо-глюкозной депривации в отсутствие меконовой кислоты количество живых клеток составило 12%. Добавление МК в культуру нейронов мозжечка, подвергшихся кислородо-глюкозной депривации, способствовало увеличению выживаемости клеток. Статистически значимое отличие в количестве живых клеток между исследуемыми концентрациями не наблюдалось, однако максимальный эффект наблюдался при концентрации 1 мМ и составил 56%, а минимальный – при концентрации 0.001 мМ и составил 31%.

На рис. 6 представлены результаты исследования влияния меконовой кислоты на уровень внутриклеточного кальция при эксайтотоксическом воздействии глутаматом.

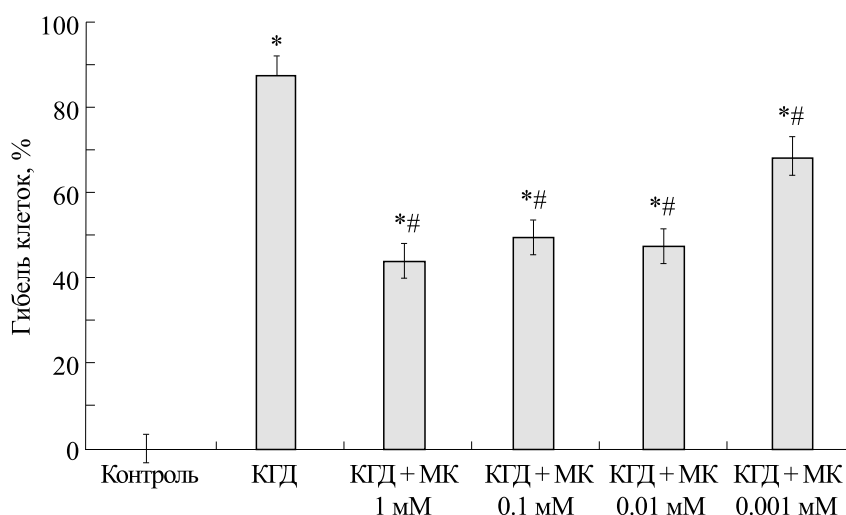


Рис. 5. Влияние меконовой кислоты на выживаемость нейронов мозжечка при кислородо-глюкозной депривации. Данные представлены в виде $M \pm m$; * – $p < 0.05$ к контролю; # – $p < 0.05$ к кислородо-глюкозной депривации.

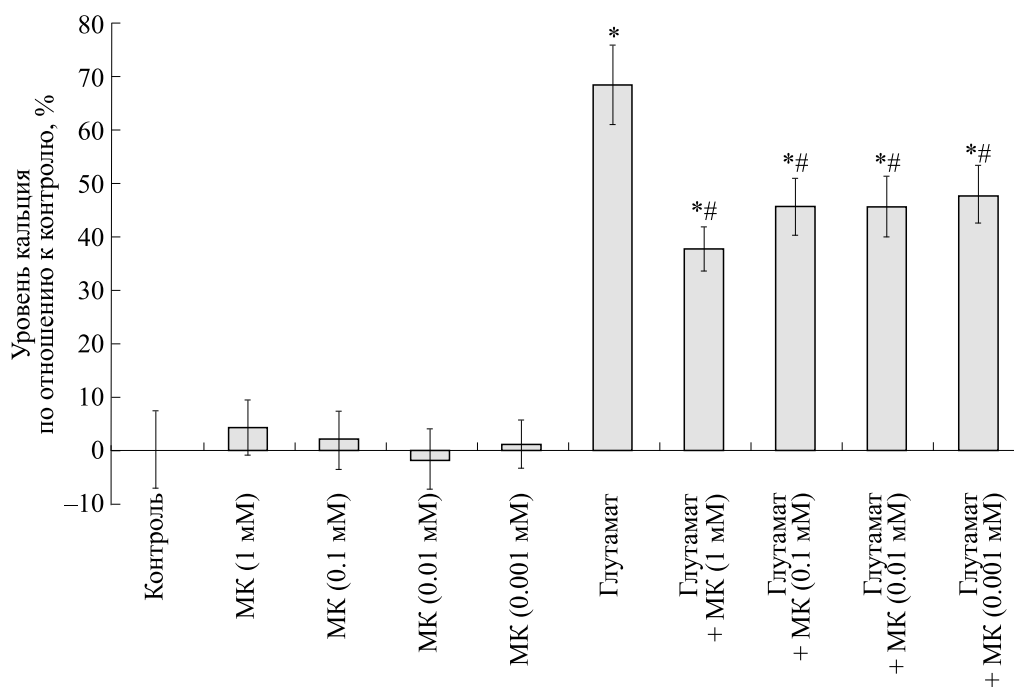


Рис. 6. Влияние меконовой кислоты на уровень внутриклеточного ионов кальция при глутаматной токсичности. Данные представлены в виде $M \pm t$; * – $p < 0.05$ к контролю; # – $p < 0.05$ к глутамату.

Анализ полученных данных показал, что воздействие глутаматом приводит к возрастанию уровня кальция на 69% по отношению к контролю. С другой стороны, в культурах с добавлением МК повышение уровня кальция было существенно меньше и составило 38, 46, 46 и 48% по отношению к контролю соответственно для концен-

траций 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ. В культурах, не подвергшихся глутаматному воздействию, МК не оказала статистически достоверного влияния на концентрацию ионов кальция в цитозоле нейронов мозжечка.

На рис. 7 показано, что воздействие глутаматом на клетки головного мозга приводит к сниже-

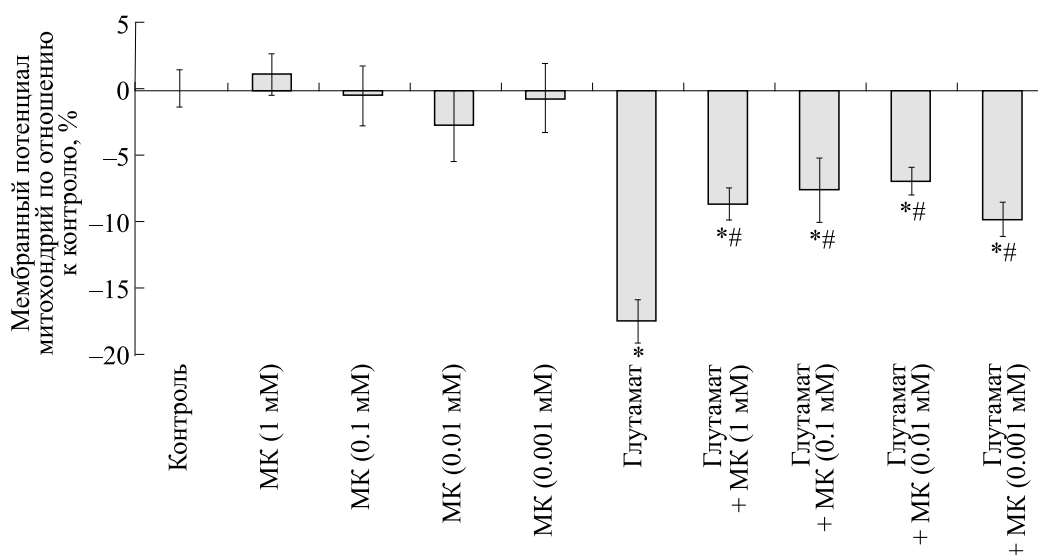


Рис. 7. Влияние меконовой кислоты на мембранный потенциал митохондрий при глутаматной токсичности. Данные представлены в виде $M \pm t$; * – $p < 0.05$ к контролю; # – $p < 0.05$ к глутамату.

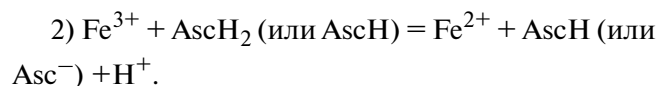
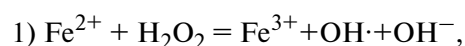
нию мембранного потенциала митохондрий на 17% по отношению к контролю. Меконная кислота способствовала меньшему снижению значения мембранного потенциала митохондрий – на 9, 8, 7 и 10% по сравнению с контролем соответственно для концентраций 1.0, 0.1, 0.01 и 0.001 мМ.

Добавление меконной кислоты в культуру нейронов мозжечка способствует снижению гибели клеток при кислородном и глюкозном голодании, препятствует повышению внутриклеточного уровня кальция и снижению мембранного потенциала митохондрий при глутаматном воздействии – одних из ключевых факторов, приводящих к повреждению клеток. Таким образом, МК препятствует эксайтотоксическому действию глутамата, оказывая цитопротекторный эффект на культуру нейронов мозжечка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для МК возможна реализация трех возможных механизмов антиоксидантной активности: прямой перенос атома водорода (НАТ), одноэлектронный перенос с последующим депротонированием (SET-PT) и депротонирование с последующим одноэлектронным переносом (SPLET) [33]. Поскольку вероятность реализации механизмов НАТ и SET-PT в водной среде невелика [34], то можно предположить, что основным механизмом реализации прямого антиоксидантного эффекта меконной кислоты является SPLET-механизм, для которого и была рассчитана энтальпия одноэлектронного переноса. Как видно из диаграммы протеолитического равновесия МК при физиологических рН может находиться в двух состояниях: дианионной форме HMe^{2-} (99.82%) и трианионной Me^{3-} (0.018%) с соответствующими энергиями отрыва электрона 421.3 и 318.7 кДж/моль. Расчетные значения энергии переноса электрона для МК ниже, чем у природных антиоксидантов – катехинов [33], а экспериментально полученные значения ингибирования развития свободнорадикальных реакций выше, чем у лекарственного антиоксидантного препарата «Мексидол». Все это указывает на высокий уровень прямого антиоксидантного потенциала меконной кислоты. Также ее прямой антиоксидантный эффект может реализоваться за счет способности МК вступать во взаимодействие с ионами железа и образовывать координационные комплексы. Койевая кислота, близкая по строению к МК, способна к образованию хелатных комплексов с ионами железа и алюминия [35]. В последнее время в литературе появляется все больше сведений о влиянии нарушения мета-

болизма железа и развития неврологических заболеваний. Так, у пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, наблюдается повышенное накопление ионов железа в гиппокампе [36]. Применение хелаторов железа, таких как дефероксамин, увеличивает уровень дофамина в клетках черной субстанции и предупреждает развитие окислительного стресса у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона [37]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* на грызунах показали, что применение ферростатина-1 оказало защитный эффект при моделировании болезни Гентингтона [38]. Установлено, что при всех видах инсульта происходит аккумуляция ионов железа, а применение их хелаторов приводит к значительному улучшению состояния пациентов [39]. Основной причиной патологического действия ионов Fe^{2+} является развитие реакции Фентона и усиление на фоне этой реакции процессов перекисного окисления липидов, которое сопровождается снижением восстановленного глутатиона и активности глутатионпероксидазы в нейронах головного мозга. Следует отметить роль ионов железа (III) в развитии повреждающего эффекта. Восстановление ионов Fe^{3+} , образующихся в результате реакции Фентона, аскорбиновой кислотой открывает дополнительный канал для образования активных форм кислорода [40]. Относительно высокие концентрации аскорбиновой кислоты и ионов железа в головном мозге способствуют развитию следующих реакций и созданию повреждающего цикла:



Разорвать данный замкнутый круг можно применением хелаторных лигандов или/и веществ с прямым антиоксидантным эффектом. Таким образом, хелатирование ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в тканях головного мозга при окислительном стрессе может ингибировать развитие реакции Фентона и обрывать одну из цепей свободнорадикального окисления, а также выводить избыточное железо из поврежденных отделов головного мозга при нейродегенеративных процессах. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать хелаторы железа как потенциальные нейропротекторы [16–18]. Результаты наших исследований показали, что при физиологическом значении рН преобладает комплекс с соотношением меконная кислота/ Fe^{3+} 3 : 1 в значении ~97% с высокой константой устойчивости, тогда как на долю комплекса составом 2 : 1 приходится ~3%.

Эти данные позволяют говорить о возможном хелатировании ионов железа МК в тканях головного мозга и уменьшению интенсивности окислительных процессов за счет ингибирования реакции Фентона, и, как следствие, снижению повреждения и гибели нейронов.

При развитии нейродегенеративных заболеваний появляется астроцитарная дисфункция, обусловленная нарушением работы глутаматного транспортера EAAT-1 [41]. При болезни Альцгеймера A β 1-42 индуцирует глутаматную токсичность за счет изменения функциональной активности обратного захвата глутамата из синаптической щели [42]. При рассеянном склерозе происходит подавление экспрессии генов, ответственных за синтез переносчика глутамата в олигодендроцитах и астроцитах за счет повышения провоспалительных факторов [43]. Вызванная на фоне ишемического повреждения головного мозга деполяризация приводит к нарушению работы глутаматного транспортера и накоплению возбуждающей аминокислоты в синаптической щели [44]. Эксайтотоксичность и окислительный стресс являются взаимоусиливающими звеньями одного патологического процесса. С одной стороны, активация AMPA- и NMDA-рецепторов и Ca²⁺-каналов L-типа приводит к активации ряда ферментов и вторичных мессенджеров, приводящих к развитию воспалительного процесса и отягощению окислительного стресса. Например, гиперактивность Ca²⁺-зависимой n-NOS приводит к гиперпродукции активных форм азота, таких как оксид азота и высокотоксичный пироксинитрит, и усилению интенсивности окислительных процессов в нейронах [45]. Высвобождение арахидоновой кислоты в результате активации фосфолипазы А способствует выработке эйкозаноидов, стимулирующих провоспалительный ответ [46]. С другой стороны, повышенная продукция свободных радикалов в поврежденных отделах головного мозга приводит к повреждению глиальных клеток и, как следствие, еще более сильному нарушению работы глутамат/глутаминовой системы и накоплению возбуждающей аминокислоты в синаптическом пространстве [47]. Снижение уровня гибели нейронов мозжечка и уровня цитозольного кальция в них на фоне глутаматной токсичности, установленное в нашей экспериментальной работе, может быть реализовано за счет прямого антиоксидантного эффекта меконовой кислоты по механизму одноэлектронного переноса на радикальную частицу. Таким образом, снижение интенсивности окислительного стресса МК может облегчить эксай-

тотоксический эффект глутамата. Можно предположить, что действие МК приводит к активации некоторых сигнальных путей, за счет которых может развиваться нейропротекторный потенциал. В литературе встречаются данные, на основании которых можно выдвинуть вышеуказанное предположение, однако, таких работ мало, и это требует более детальных экспериментальных исследований. В работе [48] было показано, что коеновая кислота подавляет фокальный ответ нейронов на переживающих срезах гиппокампа. Предварительная аппликация срезов пикротоксином, являющимся антагонистом рецепторов гамма-аминомасляной кислоты, предотвращала тормозное действие коеновой кислоты. Можно предположить, что меконовая кислота, схожая по строению с коеновой кислотой также может являться агонистом рецепторов гамма-аминомасляной кислоты и оказывать тем самым защитный эффект при гиперстимуляции глутаматных рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в данном исследовании экспериментальные данные о физико-химических свойствах меконовой кислоты и установленный в отношении данного соединения цитопротекторный и антиоксидантный эффект в экспериментах *in vitro* дает основания рассматривать данное вещество как возможный нейропротектор и создает необходимые предпосылки для дальнейшего изучения защитного действия меконовой кислоты, а также других представителей кислот гамма-пировинового ряда на ткани головного мозга при моделировании различных нейродегенеративных процессов. Полученные в работе данные о ее физико-химических свойствах могут быть полезны для синтеза и изучения биологических свойств новых координационных соединений на основе меконовой кислоты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках Конкурса научно-инновационных проектов, ориентированных на коммерциализацию № НИП-20.1/15 и государственного задания ЮНЦ РАН № 122020100351-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Я. Шурыгин, *Препарат Баллиз* (Периодика Кубани, Краснодар, 2002).
2. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева и А. А. Кравцов, *Эксперим. клинич. фармакология*, **81** (4), 3 (2018).
3. Л. В. Шурыгин, Э. И. Злищев, А. Н. Кравцова и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **163** (3), 325 (2017).
4. А. А. Кравцов, А. Я. Шурыгин, Н. С. Скороход и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **150** (10), 410 (2010).
5. Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева и А. А. Кравцов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **165** (4), 457 (2018).
6. Р. В. Кондратенко, А. Н. Чепкова, А. Я. Шурыгин и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **136** (11), 523 (2003).
7. D. S. Kim, S. J. Kim, M. C. Kim, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **35** (5), 666 (2012).
8. H. A. Oh, H. M. Kim, and H. J. Jeong, *Int. Immunopharmacol.*, **11** (1), 39 (2011).
9. И. В. Рогачевский, В. Б. Плахова, И. Н. Домнин и др., *Клинич. патофизиология*, **1**, 15 (2006).
10. Б. В. Крылов и др., Пат. РФ № 2322977 С1, *Бюл. изобретений*, № 12 (2008).
11. N. N. Bukov, L. I. Ivashchenko, and V. T. Panyushkin, *Rus. J. Gen. Chem.*, **91** (4) 1 (2021).
12. O. V. Vetrovoy, E. A. Rybnikova, and M. O. Samoilov, *Biochemistry*, **82** (3), 392 (2017).
13. L. Mezzaroba, D. F. Alfieri, and A. N. Colado Simão, *Neurotoxicology* **74**, 230 (2019).
14. J. Li, F. Cao, H. L. Yin, et al., *Cell Death Dis.*, **11** (2), 88 (2020).
15. P. Dusek, P. M. Roos, T. Litwin, et al., *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, **31**, 193 (2015).
16. X. Wei, X. Yi, X. H. Zhu, et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2020**, 1 (2020).
17. R. J. Ward, D. T. Dexter, A. Martin-Bastida, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (7), 3338 (2021).
18. S. Entezari, S. M. Haghi, N. Norouzkhani, et al., *J. Toxicol.*, **2022**, 1 (2022).
19. I. A. Mulder, E. T. van Bavel, H. E. de Vries, et al., *Fluids and Barriers of the CNS*, **18** (1), 46 (2021).
20. B. Bargagna, L. Ciccone, S. Nencetti, et al., *Molecules*, **26** (19), 6015 (2021).
21. S. Paul and E. Candelario-Jalil, *Exp. Neurol.*, **335**, 1 (2021).
22. С. В. Козин, А. А. Кравцов, С. В. Кравченко и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **171** (5), 592 (2021).
23. P. Güntzel, L. Forster, C. Schollmayer, et al., *Org. Prepar. Procedures Int.*, **50** (5), 512 (2018).
24. I. A. Antipova, S. A. Mukha, and S. A. Medvedeva, *Rus. Chem. Bull.*, **53** (4), 780 (2004).
25. Л. В. Шурыгина, А. А. Кравцов, С. В. Козин и др., *Растительные ресурсы*, **53** (2), 291 (2017).
26. F. Neese, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, **2**, 73 (2011).
27. A. D. Becke, *Phys. Rev. A*, **38**, 3098 (1988).
28. S. Grimme, S. Ehrlich, and L. Goerigk, *J. Comput. Chem.*, **32**, 1456 (2011).
29. F. Weigend and R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 3297 (2005).
30. J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, *Chem. Rev.*, **105**, 2999 (2005).
31. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина и др., *Биофизика*, **64** (2), 362 (2019).
32. A. Kravtsov, S. Kozin, A. Basov, et al., *Molecules*, **27** (1), 243 (2022).
33. S. Anitha, S. Krishnan, K. Senthilkumar, et al., *Mol. Physics*, **118**, 17 (2020).
34. J. Rimarcik, V. Lukes, E. Klein, et al., *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **952**, 25 (2010).
35. V. M. Nurchi, G. Crisponi, J. I. Lachowicz, et al., *J. Inorg. Biochem.*, **104** (5), 560 (2010).
36. E. P. Raven, P. H. Lu, T. A. Tishler, et al., *J. Alzheimer's Dis.*, **37** (1), 127 (2013).
37. B. Do Van, F. Gouel, A. Jonneaux, et al., *Neurobiol. Dis.*, **94**, 169 (2016).
38. J. J. Zhang, J. Du, N. Kong, et al., *Ann. Translat. Med.*, **9** (19), 1503 (2021).
39. X. L. Fang, S. Y. Ding, X. Z. Du, et al., *Front. Neurol.*, **13** (2022).
40. O. Y. Selyutina, P. A. Kononova, V. E. Koshman, et al., *Antioxidants (Basel)*, **11** (2), 376 (2022).
41. S. Satarker, S. L. Bojja, P. C. Gurram, et al., *Cells*, **11** (7), 1139 (2022).
42. A. Scimemi, J. S. Meabon, R. L. Woltjer, et al., *J. Neurosci.*, **33** (12), 5312 (2013).
43. S. Garofalo, G. Cocozza, G. Bernardini, et al., *Brain, Behavior, and Immunity*, **105**, 1 (2022).
44. Z. Shen, M. Xiang, C. Chen, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **151** (2022).
45. A. Jurcau and A. I. Ardelean, *Biomedicines*, **10** (3), 574 (2022).
46. M. Regulaska, M. Szuster-Głuszczyk, E. Trojan, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **19** (2), 278 (2021).
47. M. Verma, B. N. Lizama, and C. T. Chu, *Translat. Neurodegeneration.*, **11** (1), 3 (2022).
48. А. А. Кхрапов, А. Н. Чепкова, А. Я. Шурыгин, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **125** (1), 53 (1998).

Meconic Acid Is a Possible Neuroprotector: Justification on *In Vitro* Experiments and Its Physico-Chemical Properties

S.V. Kozin^{*, **}, L.I. Ivashchenko^{*}, A.A. Kravtsov^{*, **}, L.V. Vasilyeva^{*}, A.M. Vasiliev^{*}, N.N. Bukov^{*}, A.A. Dorohova^{*, **}, O.M. Lyasota^{*, **}, A.V. Bespalov^{*}, and S.S. Dzhimak^{*, **}

^{*}Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

^{**}Federal Research Center "Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

Main representatives of gamma pyronic acid are meconic, comenic, chelidonic and kojic acid. It was found that comenic acid exerts a neuroprotective effect, and chelidonic acid has a pronounced anti-inflammatory effect. It was not studied whether meconic acid exhibits neuroprotective effects. The aim of this work was to assess the neuroprotective potential of meconic acid, taking into account its physicochemical properties, using an *in vitro* model of ischemic stroke. Primary neuroglial culture was obtained from the cerebellum of 7–8-day-old Wistar rat pups by mechanical tissue dissociation. The protective effect of meconic acid on the culture of cerebellar neurons was studied using the model of glutamate toxicity and oxygen-glucose deprivation. Quantum mechanical calculations were used and experiments in the model system citrate-phosphate-luminol were conducted by the method of chemiluminescent analysis to investigate the antioxidant activity of meconic acid. The chelating properties of meconic acid with respect to Fe^{3+} in solutions were studied using Job's method. Meconic acid has been found to have a protective effect in *in vitro* models of ischemia. Its action leads to a decrease in the level of intracellular calcium and the restoration of the membrane potential of mitochondria in a culture of cerebellar neurons under glutamate exposure, resulting in an increase in the percentage of living cells under oxygen-glucose deprivation. Meconic acid has a high calculated antioxidant potential, confirmed experimentally. With an increase in the pH of the medium, stepwise binding of meconic acid with Fe^{3+} occurs with the formation of complexes with different ligand/metal ratios. At physiological pH, the composition of the resulting complex is 1 : 3. The obtained antioxidant, chelating, and cytoprotective action of meconic acid provides a basis for further study of the possible neuroprotective properties of this compound in *in vivo* experiments, and the data obtained in the work on its physicochemical properties can be useful for the synthesis and study of new coordination compounds based on meconic acid.

Keywords: antioxidant activity, meconic acid, cerebellar neuron culture, glutamate toxicity, oxygen-glucose deprivation, neuroprotection, iron complexes