

Є. В. Мокляк, Н. О. Власенко, О. М. Важнича

## Уміст еритропоетину при корекції похідним 3-гідроксипіридину гострого стресу з різним ступенем ушкодження системи еритрону

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

**Ключові слова:** 3-гідроксипіридин, мексидол, еритропоетин, стрес, крововтрата, іммобілізація

Вирішальне значення в регуляції еритропоезу має еритропоетин (ЕПО), який утворюється в нирках і, меншою мірою, у печінці, селезінці, кістковому мозку [1]. Ефекти ЕПО полягають у регуляції проліферації та диференціації колоніе-утворюючих одиниць еритроцитарних, про- та еритробластів, прискоренні синтезу гемоглобіну в еритроїдних клітинах та ретикулоцитах, ініціації синтезу цитоскелету еритроцитів, гальмуванні апоптозу, збільшенні кровообігу в мієлоїдній тканині та виході в циркуляцію ретикулоцитів [2]. Сигнальні шляхи трансдукції гена еритропоетину пов'язані з кисневим сенсором нирок та фактором, що індукується гіпоксією-1 (HIF-1 $\alpha$ ) [3], адренергічною стимуляцією [3, 4] та зниженням рівня заліза в організмі за рахунок його втрати або хелатування [5]. Показано, що стрес супроводжується змінами вмісту ЕПО у плазмі крові та кістковому мозку, що забезпечує розвиток відомої адаптивної реакції еритрону – постстресорної активації еритропоезу [6], а також може бути основою для реалізації його нейропротекторної дії [7].

Водночас практично не вивчено, як впливають на індукцію ЕПО стреспротективні засоби. Встановлення того факту, що відомий стреспротектор 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину (ГП) сукцинат (мексидол) неоднозначно діє на еритропоез при анемічному (викликаному крововтратою) та іммобілізаційному стресі [8, 9], дозволило припустити, що ці відмінності пов'язані з регуляцією препаратом рівня ЕПО в

організмі. *Мета дослідження* – вивчити особливості впливу 2-етил-6-метил-3-ГП сукцинату (мексидолу) на вміст ЕПО у плазмі крові експериментальних тварин при стресі з різним ступенем ушкодження еритрону.

**Матеріали та методи.** Експерименти виконано на 46 білих щурах-самцях лінії Wistar масою 180–200 г, яких утримували за стандартних умов віварію. На проведення експерименту було одержано дозвіл комісії з питань біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Гострий анемічний стрес відтворювали шляхом вилучення з серця крові в кількості 2 мл на 100 г маси тіла тварини під загальною анестезією [10]. Гострий іммобілізаційний стрес моделювали шляхом атравматичної жорсткої фіксації щурів на спині протягом 3 год [11]. За точку відліку часу приймали початок дії стресорного фактора.

Мексидол вводили тваринам інтраперитонеально в дозі 100 мг/кг маси відразу після крововтрати або початку іммобілізації. Цю дозу вибирали на основі даних літератури як таку, що знаходиться в середині діапазону ефективних доз препарату (10–300 мг/кг) [12]. Розчин мексидолу готували *ex tempore* з субстанції препарату, одержаної від виробника (ОАО «Бион», РФ). Тваринам з контрольною патологією вводили розчинник (вода для ін'єкцій). Евтаназію тварин і взяття дослідного матеріалу здійснювали через 3 та 72 год. У плазмі крові визначали вміст ЕПО методом імуоферментного аналізу [13] за допомогою наборів «Rat Erythropoietin (EPO) ELISA Kit» (Cusabio, China). Одержані результати статистично обробляли за стандартними комп'ютерними програмами. Визначення вірогідності різниці між групами

проводили з використанням критерію t Стьюдента з поправкою Бонферроні [14], що при порівнянні трьох груп (інтактні – крововтрата – крововтрата + мексидол або інтактні – іммобілізація – іммобілізація + мексидол) дорівнює  $p < 0,017$ .

**Результати та їх обговорення.** Показано, що при моделюванні анемічного стресу через 3 год після вилучення крові вміст ЕПО у плазмі не змінюється порівняно з контролем (таблиця). Через 72 год після крововтрати цей показник вірогідно зростає і перевищує такий у 2 рази як у контролі, так і в попередньому терміні спостережень.

Застосування 2-етил-6-метил-3-ГП сукцинату при анемічному стресі викликає збільшення концентрації ЕПО у плазмі крові через 3 год після крововтрати в 1,5 разу порівняно з контрольною патологією, що однак не є вірогідним (таблиця). Протягом наступного часу зростання вмісту ЕПО під дією препарату також відбувається випереджаючими темпами, і через 72 год концентрація досліджуваного гормону в плазмі крові перевищує в 2,5 разу таку в інтактних тварин, але суттєво не відрізняється від контрольної патології.

Відтворення гострого іммобілізаційного стресу викликає інтенсивніше підвищення концентрації ЕПО у плазмі крові на початковому етапі спостере-

жень, ніж моделювання анемічного стресу. У даному разі через 3 год від початку стресорного впливу вміст ЕПО збільшується вірогідно в 2,2 разу порівняно з контролем (таблиця). Через 72 год він лишається підвищеним у 2,4 разу порівняно з показниками інтактних тварин контрольної групи і не відрізняється від попереднього терміну спостережень.

Застосування мексидолу при гострому іммобілізаційному стресі супроводжується нижчими значеннями вмісту ЕПО порівняно з контрольною патологією. Зокрема, через 72 год уміст гормона під дією похідного 3-ГП зменшується в 1,6 разу порівняно з таким при стресі без фармакологічної корекції (таблиця).

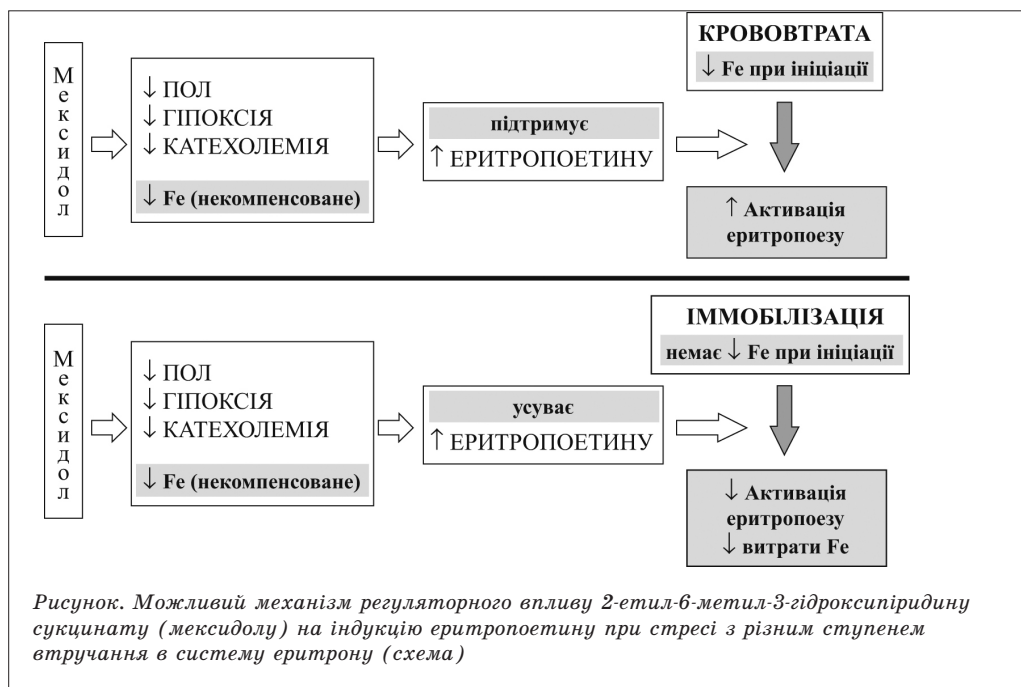
Одержані результати щодо індукції ЕПО при стресі, яка триває не тільки в стадії тривоги, а й у стадії резистентності, узгоджуються з даними літератури [6]. Збільшення секреції гормона зумовлює постстресорну активацію медулярного еритропоєзу, описану в літературі та відмічену нами за даних моделей експериментальної патології [8, 9]. Водночас привертає увагу відсутність суттєвого відгуку концентрації ЕПО на крововтрату через 3 год після вилучення крові, яке є найбільш специфічним і сильним стимулом для його секреції [15, 16]. Вочевидь такий парадоксальний

Таблиця

**Вплив мексидолу на вміст еритропоєтину в плазмі крові тварин при гострому анемічному та іммобілізаційному стресі,  $M \pm m$**

№	Група тварин		Уміст еритропоєтину, нг/мл	
	Характер впливу	Корекція	3 год	72 год
1	Інтактні	–	$1,34 \pm 0,26$ (5)	$1,34 \pm 0,26$ (5)
2	Крововтрата	Розчинник	$1,32 \pm 0,23$ (5) $P_{1-2} > 0,5$	$2,70 \pm 0,31$ (5) $P_{1-2} < 0,01$
3	Крововтрата	Мексидол	$1,98 \pm 0,10$ (6) $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$	$3,30 \pm 0,19$ (5) $P_{1-3} < 0,001$ $P_{2-3} > 0,5$
4	Іммобілізація	Розчинник	$2,98 \pm 0,18$ (5) $P_{1-4} < 0,001$	$3,19 \pm 0,37$ (5) $P_{1-4} < 0,005$
5	Іммобілізація	Мексидол	$2,17 \pm 0,23$ (5) $P_{1-4} < 0,05$ $P_{4-5} < 0,05$	$1,98 \pm 0,16$ (5) $P_{1-4} > 0,5$ $P_{4-5} < 0,01$

Примітка. У дужках наведено кількість спостережень; інтактна група – спільна для обох термінів спостережень; у таблиці наведено двічі для зручності порівняння; вірогідна різниця з поправкою Бонферроні  $p < 0,017$ .



факт можна пояснити гемодилуцією, що розвивається в цей період як одна з закономірних компенсаторних реакцій при крововтраті [17].

Виявилося, що застосування мексидолу по-різному впливає на вміст ЕПО у плазмі крові при анемічному та іммобілізаційному стресі, у першому випадку підтримуючи секрецію цього фактора, а в другому – пригнічуючи її, що узгоджується зі станом медулярного еритропоезу та вмістом ретикулоцитів у крові тварин, яким вводили похідне 3-ГП з метою фармакокорекції стрес-синдрому [8, 9]. Постає питання, який механізм може бути основою регуляторного впливу 2-етил-6-метил-3-ГП сукцинату на секрецію ЕПО при стресі з різним ступенем ушкодження еритропу. Вочевидь, такі моменти трансдукції ЕПО, як гіперкатехолемія, гіпоксія та надлишкова ліпопероксидація, усуваються мексидолом незалежно від природи стресора [18]. Слід припустити, що диференціальним фактором є втрата заліза на стадії ініціації стрес-синдрому та вплив препарату на його вміст в організмі, який згідно з припущенням Г. І. Клебанова та співавт. (2006 р.) може носити характер хелатування [19], що за умов анемічного стресу збе-

рігає (або додатково посилює) шлях трансдукції ЕПО, пов'язаний з втраченою заліза в складі гемоглобіну, тоді як при іммобілізації наслідки імовірного хелатування компенсуються за рахунок депо (рисунок).

Отже, мексидол у дозі 100 мг/кг маси тіла здатний регулювати рівень ЕПО при стресі, причому при анемічному стресі (крововтраті) препарат підтримує, а при іммобілізаційному стресі – знижує рівень цього гормону в плазмі крові в стадії резистентності стрес-синдрому (72 год).

## Висновки

1. Розвиток стрес-синдрому в білих щурів супроводжується підвищенням вмісту ЕПО у плазмі крові, що реєструється при гострому анемічному стресі (крововтраті) через 72 год, а при іммобілізаційному стресі – через 3 та 72 год від початку дії стресорного фактора.

2. 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат (мексидол) (100 мг/кг) підтримує підвищену концентрацію ЕПО у плазмі крові при крововтраті та зменшує її при іммобілізації, тобто демонструє регуляторний вплив на рівень цього гормону, що залежить від ступеня ушкодження еритропу під час ініціації стрес-синдрому.

1. Koury M. J. Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hemopoietic hormone / M. J. Koury // *Exp. Hematol.* – 2005. – V. 33. – P. 1263–1270.
2. Лебедева Е. А. Эффекты эритропоэтина в клинике и эксперименте / Е. А. Лебедева, А. Д. Беляевский, М. Е. Белоусова // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 10 (Ч. 1). – С. 157–161.
3. Бакшеев В. И. Эритропоэтин в клинической практике: прошлое, настоящее и будущее (обзор литературы) / В. И. Бакшеев, Н. М. Коломоец // *Клиническая медицина.* – 2007. – № 9. – С. 30–37.
4. Franklin Bunn H. New agents that stimulate erythropoiesis / H. Franklin Bunn // *Blood.* – 2007. – V. 109, № 3. – P. 868–873.
5. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) / C. Peyssonnaud, A. S. Zinkernagel, R. A. Schuepbach [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117, № 7. – P. 1926–1932.
6. Мамылина Н. В. Адаптационно-компенсаторные реакции в системе эритрон при экспериментальном эмоционально-болевым стрессе : дисс. д-ра биол. наук : 03.03.01 / Мамылина Наталья Владимировна. – Челябинск, 2012. – 365 с.
7. Genc S. I. Erythropoietin and the nervous system / S. I. Genc, T. F. Koroglu, K. Genc // *Brain Res.* – 2004. – V. 1000, № 1–2. – P. 19–31.
8. Власенко Н. О. Вплив 2-етил-6-метил-3-оксипіридину сукцинату на регенераторну реакцію еритроноу при гострій крововтраті / Н. О. Власенко, О. М. Важнича // *Фармацевтичний часопис.* – 2013. – № 1 (25). – С.181–185.
9. Власенко Н. О. Дія мексидолу на постстресорну активацію еритро- та грануло-моноцитопоезу в кістковому мозку / Н. О. Власенко // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2013. – № 1 (32). – С. 39–43.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / [наук. ред. О. В. Стефанов]. – К. : Авіцена, 2001. – 527 с.
11. Горизонтов П. Д. Стресс и система крови / П. Д. Горизонтов, О. И. Белоусова, М. И. Федотова. – М. : Медицина, 1983. – 240 с.
12. Воронина Т. А. Мексидол. Основные эффекты, механизм действия, применение / Т. А. Воронина. – М., 2005. – 20 с.
13. Иммуно-ферментный анализ : руководство / [под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхоффа] ; [пер. с англ., под ред. А. М. Егорова]. – М. : Мир, 1988. – 444 с.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – [пер. с англ. Ю. А. Данилова]. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
15. Paulson R. F. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells / R. F. Paulson, L. Shi, D. C. Wu // *Curr. Opin. Hematol.* – 2011. – V. 18, № 3. – P. 139–145.
16. Erythroid expansion and survival in response to acute anemia stress: the role of EPO receptor, GATA-1, Bcl-xL and caspase-3 / G. R. Aispuru, M. V. Aguirre, J. A. Aquino-Esperanza [et al.] // *Cell. Biol. Int.* – 2008. – V. 32, № 8. – P. 966–978.
17. Усенко Л. В. Интенсивная терапия при кровопотере : [практическое руководство] / Л. В. Усенко, Г. А. Шифрин. – Днепропетровск : Издательство «Новая идеология», 2007. – 290 с.
18. Яснецов В. В. Защитный эффект производных 3-гидрокси-пиридина в экстремальных условиях / В. В. Яснецов // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* – 2007. – Т. 41, № 6. – С. 5–12.
19. Клебанов Г. И. Антиоксидантная активность ингибиторов свободно-радикальных реакций, используемых в перевязочном материале для лечения ран / Г. И. Клебанов, О. Б. Любичкий, С. Е. Ильина // *Биомедицинская химия.* – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 69–82.

**Є. В. Мокляк, Н. О. Власенко, О. М. Важнича**

### **Уміст еритропоетину при корекції похідним 3-гідроксипіридину гострого стресу з різним ступенем ушкодження системи еритроноу**

В експериментах на 46 білих щурах-самцях відтворювали гострий анемічний або іммобілізаційний стрес. З метою фармакологічної корекції тваринам вводили 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат (мексидол) інтраперитонеально в дозі 100 мг/кг маси відразу після крововтрати або початку іммобілізації. Уміст еритропоетину (ЕПО) у плазмі крові визначали методом імуно-ферментного аналізу. Показано, що розвиток стрес-синдрому супроводжується підвищенням вмісту ЕПО, яке реєструється при анемічному стресі (крововтраті) через 72 год, а при іммобілізаційному стресі – через 3 та 72 год від початку дії стресорного фактора. Мексидол підтримує підвищену концентрацію ЕПО у плазмі крові при крововтраті та зменшує її при іммобілізації, тобто демонструє регуляторну дію на рівень цього гормона залежно від ступеня ушкодження еритроноу під час ініціації стрес-синдрому.

*Ключові слова:* 3-гідроксипіридин, мексидол, еритропоетин, стрес, крововтрата, іммобілізація

---

**Е. В. Мокляк, Н. А. Власенко, Е. М. Важничая**

**Содержание эритропоэтина при коррекции производным  
3-гидроксипиридина острого стресса с разной степенью повреждения  
системы эритрона**

Известно, что стресс приводит к изменениям концентрации эритропоэтина (ЭПО) в организме, что обеспечивает развитие постстрессорной активации эритропоэза, а также реализацию нейропротекторного действия ЭПО, но влияние лекарственных препаратов на вышеуказанные процессы исследовано слабо. Цель исследования – изучить особенности влияния 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (мексидола) на содержание ЭПО в условиях двух видов стресса с различной степенью повреждения системы эритрона. Острый анемический стресс (как кровопотерю) и иммобилизационный стресс воспроизводили у 46 белых крыс-самцов линии Вистар. Мексидол вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг сразу же после кровопотери или начала иммобилизации. Крысы контрольных групп получали инъекцию растворителя. Через 3 и 72 часа от начала действия стрессора животных подвергали эвтаназии. Содержание ЭПО в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа. Показано, что развитие стресс-синдрома сопровождается повышением уровней ЭПО в 2–2,4 раза ( $p < 0,01–0,001$ ) по сравнению с интактными животными, что регистрируется через 72 часа при анемическом стрессе (кровопотере) и через 3 и 72 часа при иммобилизационном стрессе. По-видимому, гемодилюция, как нормальная компенсаторная реакция, объясняет отсутствие достоверных изменений концентрации ЭПО в ранний период после кровопотери. Введение мексидола поддерживает повышенное содержание ЭПО при острой кровопотере. В то же время препарат уменьшает этот параметр в 1,6 раза ( $p < 0,01$ ) при иммобилизации, то есть проявляет регулирующее действие на уровень ЭПО в зависимости от степени повреждения эритрона во время инициации стресс-синдрома. Предполагается, что потеря железа и прямое взаимодействие производного 3-гидроксипиридина с этим элементом может быть ключевой причиной наблюдаемых особенностей.

*Ключевые слова:* 3-гидроксипиридин, мексидол, эритропоэтин, стресс, кровопотеря, иммобилизация

**Ye. V. Mokliak, N. A. Vlasenko, Ye. M. Vazhnichaya**

**Erythropoietin content in correction by 3-hydroxypyridine derivative the acute stress with various degree of erythron system damage**

It is known that stress leads to the changes in concentration of erythropoietin (EPO) in the organism that provides the development of post-stress activation of erythropoiesis as well as realization of EPO's neuroprotective action, but the influence of medicinal drugs on the mentioned processes is investigated poorly. The goal of this paper was to study the peculiarities of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (mexidol) influence on the EPO content under the conditions of two kinds of stress with different damage of erythron system. Acute anemic stress as blood loss and immobilization stress were designed in 46 albino male Wistar rats. The animals were administered with mexidol intraperitoneally in the dose of 100 mg/kg immediately after the blood loss or beginning of immobilization. Rats of control groups received the injection of solvent. After 3 or 72 h from the start of stressor's action they were euthanized. EPO content in blood plasma was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. It is shown that development of stress syndrome is accompanied by enhance of EPO levels in 2–2,4 times ( $p < 0,01–0,001$ ) as compared to intact animals that is registered within 72 h in anemic stress (blood loss), and within 3 and 72 h in the immobilization stress. Hemodilution, as a normal compensatory reaction, probably, is the reason for the absence of significant changes in EPO concentration in the early period after the blood loss. Mexidol's administration maintains enhanced EPO concentration in acute blood loss. At the same time, the drug reduces this parameter in 1,6 time in the immobilization, i.e. exhibits a regulatory effect on the level of EPO depending on the degree of erythron damage during stress syndrome initiation. It is supposed that the loss of iron and direct interaction of 3-hydroxypyridine derivative with this mineral in the body may be the key factor for the observed peculiarities.

*Key words:* 3-hydroxypyridine, mexidol, erythropoietin, stress, blood loss, immobilization

---

Надійшла: 14.02.2014 р.

**Контактна особа:** Важничая Олена Митрофанівна, доктор медичних наук, професор, кафедра експериментальної та клінічної фармакології, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Тел. +38 0 66 634 72 73. Електронна пошта: vazhnichaya@ukr.net