

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-11-3-8

## РЕТИНОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ 3-ГИДРОКСИ-6-МЕТИЛ-2-ЭТИЛПИРИДИН-*N*-АЦЕТИЛТАУРИНАТА ПРИ NMDA-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ В СЕТЧАТКЕ

С. С. Черняева, С. В. Ефименко, А. С. Победа, А. А. Пересыпкина\*,  
М. В. Покровский, Н. В. Соловьев, Ю. В. Степенко<sup>1</sup>

Глутамат способен вызывать эксайтотоксичность в сетчатке в высоких концентрациях, приводя к гибели ганглионарных клеток. Потенциальными фармакологическими веществами, способными снижать или предупреждать эксайтотоксическое повреждение сетчатки, являются производные 3-гидроксипиридина. Нами была изучена возможность фармакологической коррекции 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтаурином (EHMP-NAT) повреждений сетчатки, вызванных интравитреальным применением *N*-метил-D-аспартата (NMDA). Через 7 дней после применения NMDA было выявлено, что парабульбарное введение EHMP-NAT в дозе 4,4 мг/кг/сут с 1 по 4 день эксперимента приводит к увеличению уровня микроциркуляции в сетчатке на 48,5 %, по сравнению с группой NMDA ( $p < 0,05$ ); увеличению амплитуды а-волны на 52,7 % ( $p < 0,05$ ), б-волны — в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ), по сравнению с группой NMDA. В группе с EHMP-NAT уровень экспрессии гена каспазы-3 был меньше значения группы NMDA на 46,1 % ( $p < 0,05$ ); экспрессия NF-κB p65 значительно отличалась как от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ), так и от группы NMDA ( $p < 0,05$ ); уровень экспрессии гена p53 был на 32,4 % ниже значения группы NMDA ( $p < 0,05$ ). Таким образом, в данном эксперименте было выявлено, что механизм ретинопротекторного эффекта EHMP-NAT связан с ингибированием NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке.

**Ключевые слова:** производные 3-гидроксипиридина; NMDA; эксайтотоксичность; сетчатка; крысы; электроретинография; апоптоз.

### ВВЕДЕНИЕ

Глутамат является наиболее распространенным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС, *N*-метил-D-аспартат (NMDA) — его аналогом. В ряде работ было продемонстрировано, что интравитреальное введение NMDA приводит к апоптозу и быстрой потере ганглионарных клеток сетчатки (ГКС). Данный механизм гибели ГКС сходен с дегенерацией ГКС при глаукоме, поэтому данная модель является общепризнанной и воспроизводится на сегодняшний день во всем мире [8, 10].

Ряд исследований посвящен изучению различных производных 3-гидроксипиридина с антиоксидантной, нейропротекторной активностью для коррекции ишемических повреждений глаза и глаукомы [1, 2]. Было показано, что после ишемически-реперфузионного повреждения лечение антиапоптотическими веществами эффективно для сохранения клеточных популяций в

сетчатке [4]. Каспазы являются основными регуляторами дегенерации ГКС. Первичными каспазами, участвующими в апоптотической дегенерации ганглионарных клеток после аксотомии, являются каспаза-3 и каспаза-9 [9]. Было высказано предположение о том, что факторы транскрипции, включая NF-κB, p53 и AP-1, способствуют генерации апоптотических каскадов при повреждении ГКС [13]. Было показано, что проапоптотический белок Вах активируется как при NF-κB-, так и при p53-опосредованном апоптозе после повреждения аксонов. p53-Опосредованный апоптоз ГКС сопровождается повышением уровня Вах и Bid и активацией каспаза-3-зависимого сигнального каскада [11]. Длительная активация NMDA-рецепторов активирует проапоптотический сигнальный путь, приводящий к гибели ГКС при глаукоме и ишемических ретинопатиях. Это подтверждается ускорением апоптоза в NMDA-индуцированной эксайтотоксичности у экспериментальных крыс, мышей, кроликов и приматов [9, 13].

В предыдущем исследовании мы выявили защитное действие 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтаурилата (EHMP-NAT) на модели ишемии-репер-

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Россия, 308015, Белгород, ул. Победы, 85.

\* e-mail: annu\_87\_@mail.ru

фузии сетчатки, а также подтвердили влияние на апоптоз EHMP-NAT в дозе 4,4 мг/кг/сут при парабулбарном введении, исследовав экспрессию генов каспазы-3, NF-κB p65 и p53 в сетчатке крыс [3]. На следующем этапе нам предстояло выяснить механизм ретинопротекторного эффекта данной субстанции. В связи с этим актуальным явилось изучение возможности коррекции эксайтотоксического повреждения сетчатки при интравитреальном введении NMDA субстанцией EHMP-NAT в дозе 4,4 мг/кг/сут у крыс линии Вистар.

Таким образом, целью исследования явилось изучение ретинопротекторного эффекта EHMP-NAT в дозе 4,4 мг/кг/сут при NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были одобрены региональным этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 5/21 от 18 мая 2021 г.). Животные были получены из питомника лабораторных животных “Столбовая” (Россия). Исследование проводилось на 40 крысах линии Вистар массой 225 – 275 г. Этические принципы обращения с лабораторными крысами соблюдались в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Все манипуляции на крысах проводили после внутрибрюшинного (в/б) введения раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг.

В эксперимент были включены следующие группы:

- 1) Интактные животные ( $n = 10$ );
- 2) Контрольная группа, интравитреальное введение раствора фосфатно-солевого буфера (PBS) ( $n = 10$ );
- 3) Модель патологии, интравитреальное введение NMDA ( $n = 10$ );
- 4) Группа с коррекцией ретиальной эксайтотоксичности EHMP-NAT ( $n = 10$ ).

Моделирование патологии осуществляли путём однократной интравитреальной инъекции 2 мкл раствора, содержащего 160 нМ NMDA [10]. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объём 0,1 М раствора PBS в том же режиме введения, что и в группе с моделью. Местную анестезию проводили 0,5 % раствором алкаина, капли глазные 0,5 % (ALCON-COUVREUR N.V., S.A., Бельгия). Процедуру осуществляли с помощью шприца Hamilton (RENO, NEVADA, США). Интравитреальную инъекцию проводили под микроскопом Leica (Германия). Регистрацию показателей и выведение животных из эксперимента осуществляли через 7 дней после введения NMDA [10].

EHMP-NAT (АО Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ, Старая Купавна, Россия) вводили парабулбарно в виде 1 % раствора в дозе 4,4 мг/кг/сут ежедневно в течение

4 дней [3], включая первую инъекцию за 30 мин до введения NMDA.

Ретинопротекторный эффект EHMP-NAT оценивали по изменениям уровня микроциркуляции сетчатки с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и электроретинографии (ЭРГ) через 7 дней после введения NMDA. Экспрессию генов проапоптотических факторов в сетчатке (каспазы 3, NF-κB p65, p53) оценивали с помощью количественной ПЦР.

Регистрацию микроциркуляции осуществляли с использованием программно-аппаратного комплекса Biopac System MP-150 и датчика игольчатого типа TSD-144 (США), программы AcqKnowledge 4.2 по ранее разработанной методике в НИИ Фармакологии живых систем НИУ “БелГУ” [3]. Из значений уровня микроциркуляции в каждой точке выводили среднее, которое принимали за индивидуальный показатель уровня микроциркуляции у данного животного.

До проведения ЭРГ все животные содержались в темноте 30 мин [15]. Электрод EL452 устанавливали на роговицу, смоченную физраствором, референтный электрод помещали подкожно в области черепа, электрод EL450 помещали подкожно в области основания хвоста. Генерация вспышки осуществлялась стробоскопом TSD122В фирмы Biopac System (США). Вызванные биопотенциалы пропускались на частоте 1 – 1000 Гц, усиливались, усреднялись и представлялись графически на экране при помощи Biopac System MP-150 с использованием блока для вызванных потенциалов ERS100С (Biopac System) и компьютерной программой AcqKnowledge 4.2 (США). Запись ЭРГ проводили в течение 0,5 с у каждой крысы в группах. Значения амплитуд а- и b-волн электроретинограмм использовались для оценки функционального состояния сетчатки после коррекции EHMP-NAT ретиальной эксайтотоксичности.

Две сетчатки от одной крысы были объединены вместе как один образец. От 10 до 20 мг ткани сетчатки были очищены ледяным PBS 0,1 М перед погружением в стабилизационный раствор RNA later, чтобы избежать деградации клеточной РНК. Перед извлечением РНК ткань сетчатки обрабатывали ультразвуком в 300 мкл лизирующего буфера. Выделение суммарной РНК проводили следующим образом: образцы гомогенизировали в коммерческом растворе “Extract RNA” (Евроген, Россия) из расчета 50 мг ткани на 1 мл экстрактора. Полученную взвесь центрифугировали 5 мин при 15000 g в комнатной температуре. Затем образцы последовательно промывали и центрифугировали с хлороформом, 100 % изопропанолом и охлажденным 75 % этанолом. К полученному осадку добавляли 15 мкл дистиллированной воды, вортиксировали. Концентрацию РНК в полученном растворе определяли спектрофотометром NanoDrop 2000С (Thermo Scientific Inc., США) трехкратно. После вычисления средней концентрации образцы доводили до содержания РНК 200 нг/мл.

Реакцию обратной транскрипции для перевода РНК в кДНК проводили в амплификаторе BioRad CFX96 с использованием коммерческого набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) из расчета 11 мкл образца на 9 мкл набора для обратной транскрипции. Температурные условия реакции: 60 мин при 39 °С + 10 мин при 70 °С. Затем для оценки экспрессии целевых генов в амплификаторе BioRad CFX96 проводили ПЦР образцов с использованием коммерческого набора SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и олигонуклеотидных праймеров (Евроген, Россия).

Праймеры были подобраны с использованием ресурса Primer-BLAST (NCBI, USA) (табл. 1). Праймеры подбирали с соблюдением ряда условий: 1) один из праймеров в паре должен отжигаться на область межэкзонного соединения; 2) прямой и обратный праймеры не должны образовывать ауто- и кросс-димеров в одной смеси; 3) размер ПЦР-продукта должен быть от 95 до 160 п.н.; 4) праймер должен покрывать максимальное количество транскриптов гена.

После проведения амплификации в амплификаторе Bio-Rad CFX96 для каждого гена рассчитывали значение относительной экспрессии по формуле:

$$E_{GOI} = 2^{-(Ct_{ACTB} - \Delta Ct_{GOI})}$$

где  $Ct_{ACTB}$  — пороговое значение цикла для референсного гена ACTB;  $\Delta Ct_{GOI}$  — изменение порогового значения цикла для целевого гена.

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро — Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение ( $M$ ) и стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Резко выделяющиеся значения у животных в каждой временной точке выявлялись с помощью статистического критерия Граббса. Если для какого-либо значения величина  $Z$  была больше критического для данного числа измерений  $N$ , этот эксперимент исключали из дальнейших расчетов. В случаях ненормального распределения были рассчитаны медиана ( $Me$ ), нижний ( $Q_1$ ) и верхний ( $Q_U$ ) квартили. Межгрупповые различия анализировались параметрическими ( $t$ -критерий Стьюдента) методами при

нормальном распределении, или непараметрическими ( $U$ -критерий Манна — Уитни) методами при ненормальном распределении. Различия были определены уровне значимости  $p = 0,05$ . Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 7 дней после введения NMDA проводили регистрацию уровня микроциркуляции в сетчатке. Результаты ЛДФ представлены в табл. 2.

На фоне введения NMDA у животных наблюдалось снижение уровня микроциркуляции в среднем до 452,5 п.е. (перфузионных единиц), что на 39,9 % меньше, чем в группе интактных животных ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе уровень микроциркуляции был сопоставим со значением группы интактных животных, что подтверждает отсутствие влияния как самого растворителя (PBS), так и процедуры интравитреального введения на данный показатель. В группе с EHMP-NAT уровень микроциркуляции вырос на 48,5 %, по сравнению с группой с моделью патологии ( $p < 0,05$ ), но не достигал значения контрольной и интактной групп.

Через 7 дней после инъекции NMDA проводили ЭРГ. Относительно группы интактных животных в группе с моделью патологии а-волна уменьшилась на 54,2 % ( $p < 0,05$ ), б-волна — на 66,9 % ( $p < 0,01$ ). Амплитуды волн а и б при введении PBS не имели достоверных отличий от группы интактных животных, что подтверждает отсутствие влияния на электрофизиологическое состояние сетчатки как самого PBS, так и физического воздействия от процедуры интравитреальной инъекции. В группе с EHMP-NAT амплитуда а-волны выросла в среднем на 52,7 % ( $p < 0,05$ ), б-волны — в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ), по сравнению с группой с моделью патологии, но средние значения амплитуд волн а и б не достигали значения контрольной и интактной групп (табл. 3).

Через 7 дней после введения NMDA в сетчатке животных и наблюдали следующие изменения в экспрессии генов: уровень экспрессии гена каспазы-3 был выше среднего значения группы интактных животных

Таблица 1. Перечень праймеров

Ген	Последовательность праймеров (5' → 3')	Температура отжига, °С
ACTB F	GACATCCGTAAGACCTCTATGCC	59
ACTB R	ATAGAGCCACCAATCCACACAGAG	
Caspase 3 F	TCCATAAAAGCACTGGAATG	59
Caspase 3 R	CTGTGATCTTCCTTAGAAACAC	
NF-κB p65 F	TTCCCTGAAGTGAGCTAGGA	61,3
NF-κB p65 R	CATGTCGAGGAAGACACTGGA	
p53 F	GTCGGCTCCGACTATACCACTATC	67,4
p53 R	CTCTTTGCACTCCCTGGGGG	

Таблица 2. Влияние 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтаурината на ретинальный кровоток при коррекции NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ ), п.е.

Экспериментальные группы	Уровень кровотока
Интактные	753,4 ± 12,2
Модель патологии (NMDA)	452,5 ± 13,5* <sup>§</sup>
Контрольная группа (PBS)	741,2 ± 10,6 <sup>#</sup>
NMDA + EHMP-NAT, 4,4 мг/кг/сут	671,8 ± 11,2* <sup>§#</sup>

Примечание:

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными;

<sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с NMDA;

<sup>§</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с PBS.

почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ); экспрессия NF-κB p65 была выше, чем в группе интактных животных в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ); уровень экспрессии гена p53 был выше среднего значения группы интактных животных почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе все определяемые показатели были сопоставимы с группой интактных животных и не имели с ней достоверных статистических отличий. В группе с EHMP-NAT уровень экспрессии гена каспазы-3 не отличался значимо от группы интактных животных и был меньше значения группы NMDA на 46,1 % ( $p < 0,05$ ); экспрессия NF-κB p65 значительно отличалась как от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ), так и от группы NMDA ( $p < 0,05$ ); уровень экспрессии гена p53 был выше среднего значения группы интактных животных на 33,7 % ( $p < 0,05$ ) и на 32,4 % ниже значения группы с моделью патологии ( $p < 0,05$ ) (табл. 4).

Нейроны сетчатки, в том числе ГКС, обладают рядом сходных свойств с нейронами ЦНС, включая неспособность к регенерации в ответ на повреждение клеток. При длительном воздействии глутамата в сетчатке накопление активных форм кислорода (АФК) изменяет экспрессию ряда генов, вызывает неправильное сворачивание белков и другие события, приводящие к апоптозу [7]. Это говорит о том, что ключевыми факторами выживания ГКС являются нейропротекторные механизмы.

Таблица 4. Экспрессия генов проапоптотических факторов в сетчатке при коррекции NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтауринатом ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )

Экспериментальные группы	Ген каспазы-3	Ген NF-κB p65	Ген p53
Интактные	0,97 ± 0,09	1,05 ± 0,07	0,95 ± 0,09
Модель патологии (NMDA)	1,93 ± 0,14* <sup>§</sup>	2,69 ± 0,15* <sup>§</sup>	1,88 ± 0,16* <sup>§</sup>
Контрольная группа (PBS)	0,97 ± 0,07 <sup>#</sup>	1,08 ± 0,06 <sup>#</sup>	0,97 ± 0,08 <sup>#</sup>
NMDA + EHMP-NAT, 4,4 мг/кг/сут	1,04 ± 0,09 <sup>#</sup>	1,84 ± 0,12* <sup>§#</sup>	1,27 ± 0,12* <sup>§#</sup>

Примечание:

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными;

<sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с NMDA;

<sup>§</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с PBS.

Таблица 3. Влияние 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтаурината на амплитуды а- и b-волн ЭРГ при коррекции NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ ), μВ

Экспериментальные группы	Амплитуда а-волны	Амплитуда b-волны
Интактные	115,9 ± 8,8	214,2 ± 9,7
Модель патологии (NMDA)	53,1 ± 5,2* <sup>§</sup>	70,8 ± 6,3* <sup>§</sup>
Контрольная группа (PBS)	113,5 ± 7,4 <sup>#</sup>	211,3 ± 8,5 <sup>#</sup>
NMDA + EHMP-NAT, 4,4 мг/кг/сут	81,1 ± 8,3* <sup>§#</sup>	177,3 ± 9,2* <sup>§#</sup>

Примечание:

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными;

<sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с NMDA;

<sup>§</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с PBS.

Одними из ионотропных рецепторов глутамата являются NMDA-рецепторы, которые играют важную роль в изменении синаптической передачи в зрительном пути [14]. Подтипы рецепторов глутамата обладают различными биохимическими свойствами и выполняют критическую синаптическую функцию, при которой нарушение работы этих рецепторов может привести к потере синаптической пластичности, например, при ишемии, глаукоме, болезни Альцгеймера и деменции. В нормальном зрительном пути глутамат непрерывно высвобождается фоторецепторами к биполярным и ганглионарным клеткам для передачи визуальной информации от сетчатки к головному мозгу [12].

Сверхактивация NMDA-рецепторов может быть дополнительной причиной ретинальных повреждений из-за снижения кровоснабжения сетчатки. Как сообщают авторы, однократная интравитреальная инъекция NMDA вызывает повреждение сетчатки, аналогичное повреждению при ретинальной ишемии-реперфузии [14]. Было выдвинуто предположение о том, что интравитреальное применение NMDA вызывает нарушение эндотелийзависимых сосудорасширяющих механизмов, которые ухудшают ретинальный кровоток, что приводит в итоге к дегенерации сетчатки. Чрез-

мерная стимуляция NMDA-рецепторов приводит к притоку внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Избыток внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  активирует протеазы, нуклеазы и липазы, что приводит к образованию свободных радикалов [7].

Объектом исследования явилось новое соединение – 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридин-*N*-ацетилтауринат, содержащее 2 фармакофора: 3-гидроксипиридин и ацетилтауринат. Как известно, 3-гидроксипиридин оказывает антиоксидантный эффект и способствует коррекции глутаматной эксайтотоксичности [3]. Уровень таурина в сетчатке является важнейшим фактором для предотвращения повреждения ГКС. Таурин может предотвращать дегенерацию ГКС *in vitro* и *in vivo*, что было показано на крысах с глаукомой и на модели пигментного ретинита (крысах P23H). Кроме того, таурин способен частично предотвращать NMDA-индуцированную эксайтотоксичность [6].

В нашем исследовании ЭРГ использовалась для подтверждения того, были ли изменения микроциркуляции в сетчатке связаны с функциональными изменениями на фоне введения NMDA. Амакринные и биполярные клетки, расположенные во внутреннем ядерном слое сетчатки, а также ГКС чувствительны к ишемии и NMDA-опосредованному повреждению сетчатки [5]. Результаты настоящего исследования демонстрируют, что парабульбарное введение крысам ЕНМР-НАТ в дозе 4,4 мг/кг/сут в течение 4 дней улучшало электрофизиологию сетчатки при NMDA-опосредованной эксайтотоксичности, что выражалось в достоверном увеличении амплитуд а- и b-волн на 7 сутки эксперимента.

Выявленные изменения в экспрессии генов каспазы-3, NF- $\kappa$ B p65, p53, участвующих в апоптозе нейронов сетчатки, на модели NMDA-опосредованной эксайтотоксичности сопоставимы с данными, полученными нами на модели ретинальной ишемии-реперфузии, что подтверждает общность механизмов апоптоза в сетчатке при данных модельных патологических состояниях у крыс линии Вистар и вклад гиперактивации NMDA-рецепторов в патогенез ишемии-реперфузии сетчатки. В настоящем исследовании выявлено, что механизм ретинопротекторного эффекта ЕНМР-НАТ связан с ингибированием NMDA-опосредованной эксайтотоксичности в сетчатке.

## ВЫВОДЫ

1. По данным ЛДФ, проведенной через 7 дней после интравитреального введения крысам NMDA, показано, что в группе с парабульбарным введением ЕНМР-НАТ в дозе 4,4 мг/кг/сут с 1 по 4 день эксперимента уровень микроциркуляции в сетчатке вырос на 48,5 %, по сравнению с группой с моделью патологии ( $p < 0,05$ ), но не достигал значения интактной группы.

2. По данным ЭРГ, проведенной через 7 дней после интравитреального введения крысам NMDA, выявлено,

что в группе с введением ЕНМР-НАТ в дозе 4,4 мг/кг/сут с 1 по 4 день эксперимента амплитуда а-волны выросла 52,7 % ( $p < 0,05$ ), b-волны — в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ), по сравнению с группой с моделью патологии, но средние значения амплитуд а- и b-волн не достигали значения интактной группы.

3. В результате проведения количественной ПЦР обнаружено, что в группе с ЕНМР-НАТ уровень экспрессии гена каспазы-3 не отличался значимо от группы интактных животных и был меньше значения группы NMDA на 46,1 % ( $p < 0,05$ ); экспрессия гена NF- $\kappa$ B p65 значительно отличалась как от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ), так и от группы NMDA ( $p < 0,05$ ); уровень экспрессии гена p53 был выше среднего значения группы интактных животных на 33,7 % ( $p < 0,05$ ) и на 32,4 % ниже значения группы с моделью патологии ( $p < 0,05$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Егоров, А. А. Гветадзе, Н. Г. Давыдова, *Вестник офтальмологии*, **129**(2), 67 – 69 (2013).
2. Н. Б. Чеснокова, О. В. Безнос, Т. А. Павленко и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **158**(9), 332 – 335 (2014).
3. S. V. Efimenko, S. S. Chernyaeva, A. A. Peresyphkina, et al., *Res. Results in Biomed.*, **8**(3), 317 – 326 (2022); doi: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-5.
4. J. A. Fernández-Albarral, R. de Hoz, A. I. Ramírez, et al., *Neural Regen. Res.*, **15**(8), 1408 – 1416 (2020); doi: 10.4103/1673-5374.274325.
5. A. J. Fischer, C. Zelinka, N. Milani-Nejad, *Glia*, **63**(2), 313 – 327 (2015); doi: 10.1002/glia.22752.
6. N. Froger, L. Moutsimilli, L. Cadetti, et al., *Progr. Retinal and Eye Res.*, **41**, 44 – 63 (2014); doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.03.001.
7. C. Kaur, W. S. Foulds, E. A. Ling, *Clin. Ophthalmol.*, **2**(4), 879 – 889 (2008); doi: 10.2147/oph.s3361.
8. S. Kuehn, C. Rodust, G. Stute, et al., *J. Mol. Neurosci.*, **63**(3 – 4), 283 – 299 (2017); doi: 10.1007/s12031-017-0978-x.
9. L. Lambuk, I. Iezhitsa, R. Agarwal, et al., *Neurotoxicol.*, **70**, 62 – 71 (2019); doi: 10.1016/j.jneuro.2018.10.009.
10. L. Lambuk, I. Iezhitsa, R. Agarwal, et al., *Neural Regen. Res.*, **16**(11), 2330 – 2344 (2021); doi: 10.4103/1673-5374.310691.
11. L. Lambuk, A. J. Jafri, N. N. Arfuzir, et al., *Neurotoxicity Res.*, **31**(1), 31 – 45 (2017); doi: 10.1007/s12640-016-9658-9.
12. C. A. Opere, S. Heruye, Y. F. Njie-Mbye, et al., *J. Ocular Pharmacol. & Ther.*, **34**(1 – 2), 107 – 118 (2018); doi: 10.1089/jop.2017.0085.
13. K. Sakamoto, T. Okuwaki, H. Ushikubo, et al., *J. Pharmacol. Sci.*, S1347 – 8613(17), 30162 – 7 (2017); doi: 10.1016/j.jpshs.2017.09.031.
14. S. Sethuramanujam, M. M. Slaughter, *J. Neurophysiol.*, **112**(1), 193 – 203 (2014); doi: 10.1152/jn.00817.2013.
15. L. Zhang, J. An, Z. Zhang, *Chin. J. Optometry Ophthalmol.*, **15**, 323 – 326 (2013); doi: 10.3760/CMA.J. ISSN. 1674-845X.2013.06.002.

## RETINOPROTECTIVE EFFECT OF 2-ETHYL-3-HYDROXY-6-METHYLPYRIDINE-*N*-ACETYLAURINATE IN NMDA-INDUCED RETINAL EXCITOTOXICITY

S. S. Chernyaeva, S. V. Efimenko, A. S. Pobeda, A. A. Peresypkina\*, M. V. Pokrovskii, N. V. Soloviev, and Yu. V. Stepchenko

Belgorod National Research University, ul. Pobedy, 85, Belgorod, 308015 Russia

\* e-mail: anny\_87\_@mail.ru

High concentrations of glutamate can cause excitotoxicity in the retina thus leading to the death of retinal ganglion cells. The derivatives of 3-hydroxypyridine are one of the potential pharmacological agents capable of reducing or preventing excitotoxic damage to the retina. We have studied the possibility of pharmacological correction of the retinal damage caused by intravitreal administration of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) by using 3-hydroxy-6-methyl-2-ethylpyridine-*N*-acetyltaurinate (EHMP-NAT). Seven days after NMDA administration to rats, we revealed that paravulbar administration of EHMP-NAT at a dose of 4.4 mg/kg/day from day 1 to day 4 of the experiment led to an increase in the level of retinal microcirculation by 48.5% compared to the NMDA group ( $p < 0.05$ ); an increase in the amplitude of the a-wave and b-wave increased by 52.7% ( $p < 0.05$ ), and 2.5 times ( $p < 0.01$ ), respectively, compared to the NMDA group. In the EHMP-NAT group, the expression level of the Caspase 3 gene was lower by 46.1% than that in the NMDA group ( $p < 0.05$ ); the expression of NF- $\kappa$ B p65 gene differed significantly both from the intact group of animals ( $p < 0.05$ ) and the NMDA group ( $p < 0.05$ ); the expression level of the p53 gene was 32.4% lower than the corresponding value in the NMDA group ( $p < 0.05$ ). Thus, the experiment revealed that the mechanism of the retinoprotective effect of EHMP-NAT is associated with the inhibition of NMDA-induced excitotoxicity in the retina.

**Keywords:** derivatives of 3-hydroxypyridine; NMDA; excitotoxicity; retina; rats; electroretinography; apoptosis.