

УДК 616-001.34; 615.21/.26

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.39.85.001>

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ 4-ГИДРОКСИ-3,5-ДИ-ТРЕТБУТИЛ ФЕНИЛЬНУЮ ГРУППИРОВКУ, В КОНТЕКСТЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ РЕСПИРАТОРНЫХ СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

Д.И. Поздняков, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава РФ, г. Пятигорск, pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Черепно-мозговая травма является широко распространенным заболеванием с высокой социально-экономической значимостью и комплексным патогенезом. В лечении травм головного мозга все чаще используются нейропротекторные средства, среди которых выделяются вещества, оказывающие воздействие на митохондриальную функцию. Данное исследование было посвящено оценке влияния новых перспективных корректоров нарушения функционирования митохондрий нейронов, содержащих 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил фенильную группировку, на изменение активности комплексов дыхательной цепи у животных в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы. Травму мозга моделировали путем свободного падения груза на теменную область головы животного. Исследуемые вещества и референт (этилметилгидроксипиридина сукцинат) вводили на протяжении 7 дней после травмы. Оценивали изменение когнитивного и неврологического дефицита, а также активность комплексов дыхательной цепи митохондрий в митохондриальной фракции головного мозга. В итоге было установлено, что применение анализируемых веществ в большей степени, чем применение референта, способствовало восстановлению активности комплексов III–V дыхательной цепи митохондрий, что в итоге привело к снижению

неврологического и когнитивного дефицита. При этом выраженность фармакологического эффекта не зависела от типа базового скелета, который был представлен ядром пиридина и бенз-γ-пирона.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, нейропротекторы, митохондриальная дисфункция, этилметилгидроксипиридина сукцинат

Черепно-мозговую травму (ЧМТ) определяют как приобретенное повреждение головного мозга, возникшее вследствие механического воздействия. ЧМТ достаточно распространенная патология, особенно среди лиц пожилого возраста. Ежегодно регистрируется более 2,3 млн случаев ЧМТ, однако данный показатель можно считать сильно заниженным, поскольку в подавляющем большинстве случаев отмечается развитие легкой формы заболевания (80%) и пациенты редко обращаются за квалифицированной медицинской помощью [1]. Травматический характер церебральной дисфункции при ЧМТ определяет спектр клинических проявлений данного состояния. Установлено, что ЧМТ приводит к развитию неврологического, когнитивного дефицита, нарушению поведенческих реакций и проблем с сенсорным восприятием. Также важны отдаленные последствия травм

мозга, особенно периодически повторяющихся [2]. Недавние проведенные исследования показывают, что у лиц, подверженных многократной ЧМТ, наблюдаются долгосрочные инвалидизирующие нейрокognитивные и нейроповеденческие изменения, объединяемые термином «хроническая травматическая энцефалопатия» [3]. Таким образом, ЧМТ – значимая медико-социальная проблема, требующая рациональной фармакотерапии. Одним из методов лечения, применяемых в терапии ЧМТ, является использование средств нейропротекторного действия. Нейропротекция прежде всего направлена на устранение вторичных по отношению к механическому воздействию патогенетических реакций: окислительный стресс, глутаматно-кальциевая эксайтотоксичность, лактат-ацидоз, нейровоспаление, дисфункция ионных каналов [4]. Отличительным признаком ЧМТ считается митохондриальная дисфункция, ведущая к развитию энергетического дефицита, активации запрограммированной гибели клетки – апоптоза – и повышению генерации активных форм кислорода [5]. В то же время, по данным Sunpane et al., 2020, митохондрии клетки могут быть перспективными фармакотерапевтическими мишенями, действие на которые может привести к развитию нейропротекторного эффекта [6]. Ранее проведенные исследования показали, что применение соединений, в структуре которых имеется фармакофор 4-гидрокси-3,5-ди-третбутилфенил, оказывает положительное влияние на функциональную активность митохондрий, на основании чего было выдвинуто предположение, что вещества, содержащие данный фрагмент, могут проявлять митохондрио-ориентированные свойства. Для проверки данной гипотезы был синтезирован ряд новых соединений, имеющих 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил фенильный линкер, но с различным базовым скаффолдом: бенз-γ-пирон и пиримидин.

Цель исследования: оценить влияние соединений, содержащих 4-гидрокси-3,5-ди-

третбутил фенильную группировку, на изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в митохондриальной фракции головного мозга крыс в условиях экспериментальной ЧМТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

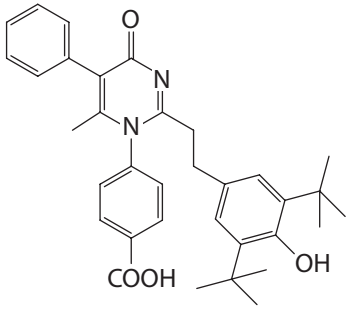
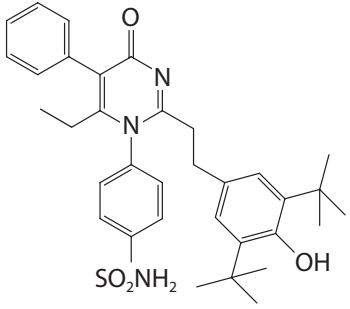
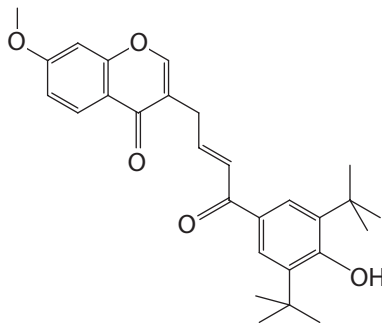
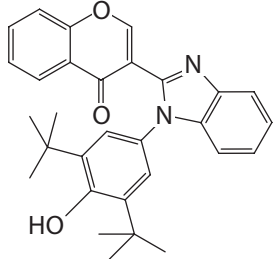
В качестве биологической модели в работе использовали 70 крыс-самцов линии Wistar, весом 240–260 г. Животные были приобретены в питомнике лабораторных животных «Рапполово» и во время проведения исследования содержались в контролируемых условиях вивария при температуре воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$, влажности воздуха 60–70% и суточном цикле 12 часов день / 12 часов ночь. Проводимые с животными процедуры и их размещение соответствовали требованиям Директивы 2010/63/EU.

ЧМТ моделировали у крыс путем механической травмы, нанесенной свободно падающим грузом массой 150 г с высоты 0,5 м. Травму наносили однократно 60 особям, после чего животных разделяли на равные группы по 10 животных в каждой группе. Нетравмированные животные (n=10) выделялись в группу интактных крыс (ИН). Из животных, которым была нанесена травма, были сформированы следующие группы: негативный контроль (НК) – крысам данной группы не проводили фармакологическую коррекцию; группа животных, получавшая референс-препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат (шифр – ЭМГПС, Мексидол, «Фармасофт», Россия); группы крыс, которым вводили изучаемые соединения (табл. 1). Исследуемые вещества были получены от Hunan Warrant Pharm. (КНР).

Препарат сравнения в дозе 100 мг/кг [7] и исследуемые вещества в дозе 50 мг/кг вводили перорально после моделирования ЧМТ на протяжении 7 дней (однократно в день). На 8-е сутки эксперимента у крыс оценивали изменение неврологического и когнитивного дефицита.

Таблица 1

ИЗУЧАЕМЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Структурная формула	Лабораторный шифр
	Pyrm1
	Pyrm2
	FC1
	FC2

Неврологический дефицит оценивали согласно шкале McGraw по сумме соответствующих баллов [8]. Когнитивные нарушения определяли по изменению числа спонтанных чередований рукавов Y-образного лабиринта [9]. После животных декапитировали под хлоралгидратной анестезией (введение

хлоралгидрата в дозе 350 мг/кг, внутрибрюшинно) и извлекали головной мозг [7].

Головной мозг крыс гомогенизировали в буферном растворе, состоящем из 1 ммоль ЭДТА + 215 ммоль маннита + 75 ммоль сахарозы + 0,1% раствор БСА + 20 ммоль HEPES, с pH 7,2. Полученный гомогенат центрифугировали при 1100g в течение 2 мин. Полученный супернатант в количестве 700 мкл переносили в пробирки Эппендорфа и наслаивали 75 мкл 10% перколла и центрифугировали при 18000g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующей среды и центрифугировали в течение 5 мин. при 10000g. Вторичный супернатант, представляющий собой митохондриальную фракцию, удаляли для проведения анализа. Все процедуры проводили при температуре 4°C. В митохондриальной фракции головного мозга оценивали активность дыхательных комплексов I, II, IV и V респирометрическим методом. В работе использовали систему лабораторного респирометра АКПМ-01Л. Активность комплекса I определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси малат/пируват (15 ммоль/л) и ротенона (1 мкМ/л). Активность комплекса II оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду сукцината (15 ммоль/л) и олигомицина (1 мкг/мл). Активность комплекса IV определяли по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси ротенон (1 мкМ/л) / TMPD/аскорбат (15 ммоль/л) и азида натрия (20 ммоль/л). Активность комплекса V оценивали по разнице потребления кислорода после внесения в среду ротенона (1 мкМ/л) и АДФ (1 ммоль/л). В ходе анализа объем биообразца составлял 275 мкл, вводимых анализаторов – 25 мкл. Потребление кислорода определяли в ррт. Активность комплекса III определяли спектрофотометрически (550 нм), по изменению оптической плотности реакционной смеси, состоящей из: 1 М раствор сукцината + 0,5 М раствор цитохрома C + 0,2 М

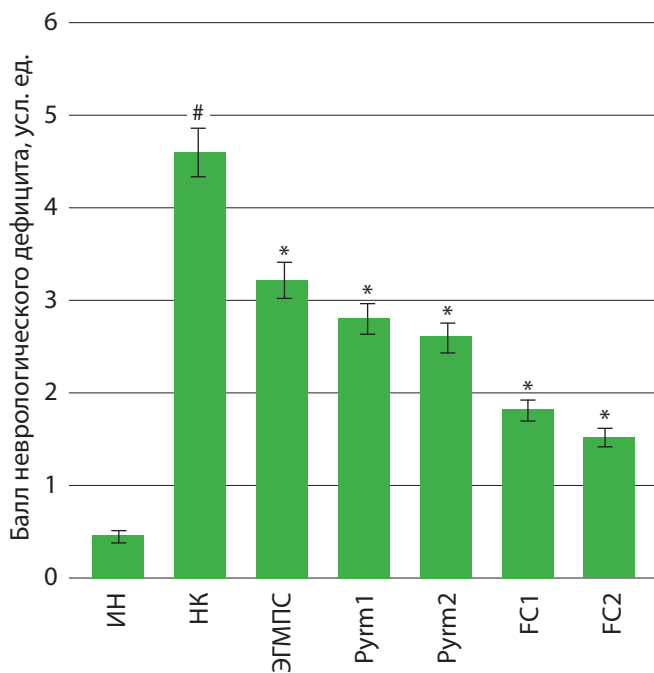
раствор KCN + 10 ммоль раствор ротенона и 10 мкл анализируемого образца. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий выражали в единицах действия в пересчете на концентрацию белка в образце, которую определяли по методу Бредфорда [10].

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. В ходе статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения данных оценивали с применением теста Шапиро – Уилка. Однородность дисперсий определяли тестом Левена. Статистически значимые отличия между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с посттестом Ньюмена – Кейлса (при нормальном распределении

данных) или посттестом Краскела – Уоллиса (при распределении данных, отличных от нормального) при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

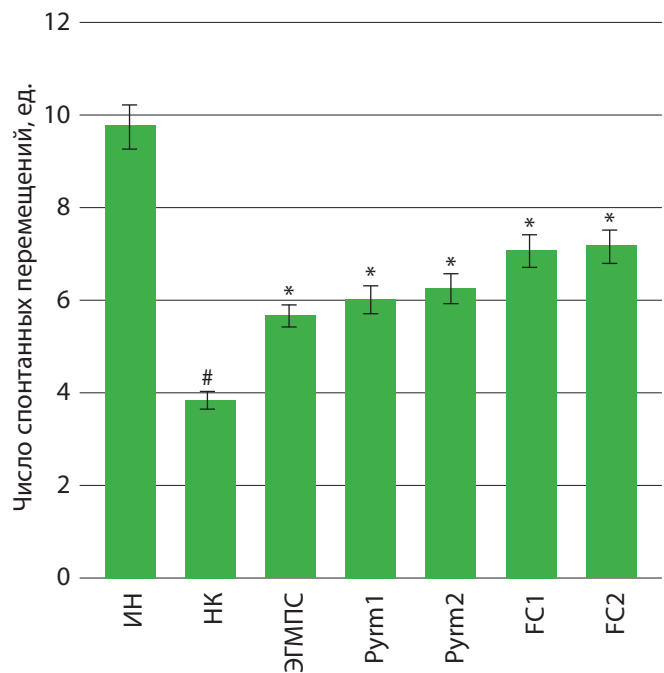
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке изменений неврологического дефицита (рис. 1) у животных с экспериментальной ЧМТ было установлено, что у НК группы крыс по отношению к ИН животным данный показатель увеличился в 10,2 раза ($p < 0,05$). Также у крыс НК группы наблюдалось развитие выраженного когнитивного дефицита (рис. 2), о чем свидетельствует снижение числа спонтанных чередований рукавов лабиринта



Примечание: ИН – интактные животные; НК – негативный контроль; ЭГМПС – группа крыс, получавшая этилметилгидроксипиридина сукцинат; Рурм1, Рурм2, FC1, FC2 – группы животных, которым вводили соответствующие исследуемые вещества; # – достоверно относительно ИН группы крыс (ANOVA с посттестом Краскела – Уоллиса, $p < 0,05$); * – достоверно относительно НК группы крыс (ANOVA с посттестом Краскела – Уоллиса, $p < 0,05$)

РИС. 1. Влияние исследуемых соединений и препарата сравнения на изменение неврологического дефицита у крыс с экспериментальной ЧМТ



Примечание: ИН – интактные животные; НК – негативный контроль; ЭГМПС – группа крыс, получавшая этилметилгидроксипиридина сукцинат; Рурм1, Рурм2, FC1, FC2 – группы животных, которым вводили соответствующие исследуемые вещества; # – достоверно относительно ИН группы крыс (ANOVA с посттестом Краскела – Уоллиса, $p < 0,05$); * – достоверно относительно НК группы крыс (ANOVA с посттестом Краскела – Уоллиса, $p < 0,05$)

РИС. 2. Влияние исследуемых соединений и препарата сравнения на изменение когнитивного дефицита у крыс с экспериментальной ЧМТ

на 60,8% ($p < 0,05$) относительно показателя ИН животных.

В митохондриальной фракции головного мозга крыс НК группы отмечалось статистически достоверное снижение активности дыхательных комплексов I–V (табл. 2) на 54,3%; 36,8; 48,4%, 57,7% и 70,3% (все показатели – $p < 0,05$). В совокупности полученные данные у НК группы крыс отражают патологический ход реакций митохондриального каскада при ЧМТ и согласуются с данными литературы [11].

Введение животным референс-препарата способствовало снижению (в сравнении с НК группой крыс) как неврологического, так и когнитивного дефицита на 30,4% и 47,4% (оба – $p < 0,05$) соответственно. Также было установлено повышение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи (табл. 2) у крыс, получавших ЭМГПС, по отношению

к животным, которым фармакологическая коррекция не проводилась: активность комплекса I повысилась на 23,8%; комплекса II – на 37,2%; комплекса III – на 25,0%; комплекса IV – на 59,1% и комплекса V – на 109,1% (все – $p < 0,05$).

У животных, получавших изучаемые соединения Pyrm1, Pyrm2, FC1 и FC2, по отношению к НК группе крыс наблюдалось снижение величины неврологического дефицита на 39,1%; 43,5%; 60,9% и 67,4% (все – $p < 0,05$) соответственно. Показатели когнитивной функции на фоне введения исследуемых соединений были выше по сравнению с аналогичными у НК группы крыс на 57,9% при применении соединения Pyrm1, на 63,2% – Pyrm2, 84,2% – FC1 и 86,8% – FC2 (все – $p < 0,05$).

Стоит отметить, что активность митохондриальных комплексов у крыс, которым

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧМТ

Группа	ИН	НК	ЭМГПС	Pyrm1	Pyrm2	FC1	FC2
Комплекс I, ЕД/мг белка	4,6±0,3	2,1±0,5#	2,6±0,6	2,8±0,6	3±0,2	3,3±0,7	3,5±0,3
Комплекс II, ЕД/мг белка	6,8±0,1	4,3±0,4#	5,9±0,6*	5±0,4	5,1±0,6	5,1±0,3	5,2±0,1
Комплекс III, ЕД/мг белка	3,1±0,2	1,6±0,2#	2±0,1*	3,2±0,2*Δ	3,0±0,1* Δ	3,3±0,1* Δ	2,9±0,3* Δ
Комплекс IV, ЕД/мг белка	5,2±0,3	2,2±0,7#	3,5±0,3*	4,9±0,1* Δ	4,8±0,2* Δ	4,2±0,1* Δ	4,4±0,1* Δ
Комплекс V, ЕД/мг белка	3,7±0,3	1,1±0,6#	2,3±0,1*	3,5±0,1* Δ	3,3±0,8* Δ	3,1±0,2* Δ	3,4±0,1* Δ

Примечание: ИН – интактные животные; НК – негативный контроль; ЭМГПС – группа крыс, получавшая этилметилгидроксипиридина сукцинат; Pyrm1, Pyrm2, FC1, FC2 – группы животных, которым вводили соответствующие исследуемые вещества; # – достоверно относительно ИН группы крыс (ANOVA с посттестом Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$); * – достоверно относительно НК группы крыс (ANOVA с посттестом Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$); Δ – достоверно относительно группы крыс, получавшей ЭМГПС (ANOVA с посттестом Ньюмена – Кейлса, $p < 0,05$)

вводили анализируемые вещества, была достоверно выше ($p < 0,05$), чем у НК группы крыс. Также необходимо подчеркнуть, что введение исследуемых соединений оказало слабое влияние на изменение активности комплексов I и II, тогда как наиболее значимо изменилась активность комплекса III и нижележащих структур митохондриальной цепи (табл. 2). При этом изменения, полученные при введении крысам изучаемых веществ, статистически значимо отличались от аналогичных параметров группы животных, получавших референс-препарат ($p < 0,05$). В то же время достоверных отличий активности дыхательных комплексов III–V между группами животных, которым вводили изучаемые соединения, установлено не было. Полученные результаты могут свидетельствовать, что в реализации митохондриальных эффектов изучаемых веществ существенную роль играет линкер 4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенил, тогда как изменение базовой структуры (пиримидин и бенз- γ -пирон) не изменяет уровень фармакологического эффекта. Вероятно, 4-гидрокси-3,5-дитретбутилфенильная группа, являясь скэвенджером активных радикалов кислорода, выступает в качестве стабилизатора реакций транспорта электронов на уровне митохондриального комплекса III, что восстанавливает аэробный метаболизм и способствует редукции клинической симптоматики ЧМТ в виде неврологического и когнитивного дефицита [12].

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало, что применение веществ, имеющих в своей структуре 4-гидрокси-3,5-дитретбутил фенильный линкер, в условиях экспериментальной ЧМТ восстанавливает активность комплексов митохондриальной дыхательной цепи, вероятно, за счет шунтирования радикалообразующей функции комплекса III. Важно, что, помимо из-

менений функционирования головного мозга на молекулярном уровне, введение изучаемых соединений способствовало уменьшению клинических проявлений ЧМТ – когнитивного и неврологического дефицита, что делает анализируемые вещества перспективными патогенетическими средствами коррекции ЧМТ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Capizzi A., Woo J., Verduzco-Gutierrez M. *Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management // Med. Clin. North Am.* – 2020; 104(2): 213–238.
2. Pavlovic D., Pekic S., Stojanovic M., Popovic V. *Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae // Pituitary.* – 2019; 22(3): 270–282.
3. Mez J., Stern R.A., McKee A.C. *Chronic Traumatic Encephalopathy // Semin. Neurol.* 2020; 40(4): 351–352. DOI: 10.1055/s-0040-1715824
4. Corps K.N., Roth T.L., McGavern D.B. *Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury // JAMA Neurol.* – 2015; 72(3): 355–362.
5. Ng S.Y., Lee A.Y. W. *Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets // Front. Cell Neurosci.* – 2019; 13:528.
6. Cunnane S.C., Trushina E., Morland C. et al. *Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing // Nat. Rev. Drug Discov.* – 2020; 19(9): 609–633.
7. Воронков А.В., Хури Е.И., Поздняков Д.И., Кульбекова Ю.Е., Кобин А.А. *Антиоксидантная активность производных пиримидин-4(1H)-она при черепно-мозговой травме в условиях эксперимента // Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2019; 82(1): 8–10.
8. Тюренков И.Н., Литвинов А.А., Волотова Е.В., Куркин Д.В., Дарманян А.П., Озеров А.А. *Сравнительная церебропротекторная активность магния оксибутирата, магния сульфата и кавинтона*

- при их профилактическом введении на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016; 79(3): 3–8.
9. Cleal M., Fontana B.D., Ranson D.C. et al. The Free-movement pattern Y-maze: A cross-species measure of working memory and executive function // *Behav. Res. Methods.* – 2021; 53(2): 536–557.
 10. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Nigaryan S.A., Khouri E.I., Miroschnichenko K.A., Sosnovskaya A.V. et al. Evaluation of the mitochondria Respirometric function in the conditions of pathologies of various geneses // *Pharmacy & Pharmacology.* – 2019; 7(1): 20–31.
 11. Pandya J.D., Leung L.Y., Yang X., Flerlage W.J., Gilsdorf J.S., Deng-Bryant Y., Shear D.A. Comprehensive Profile of Acute Mitochondrial Dysfunction in a Preclinical Model of Severe Penetrating TBI // *Front. Neurol.* – 2019; 10: 605.
 12. Оганесян Э.Т., Шатохин С.С. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (но•) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. IV. Взаимосвязь «структура – активность» между индексами ненасыщенности и производными флавонола с флороглюциновым кольцом // *Фармация и фармакология.* – 2021; 9(2): 161–169.

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF COMPOUNDS CONTAINING 4-HYDROXY-3,5-DI-TERT BUTYLPHENYL GROUP IN THE CONTEXT OF CHANGES IN THE ACTIVITY OF RESPIRATORY SUPERCOMPLEXES IN EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY

D.I. Pozdnyakov

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

Traumatic brain injury is a widespread disease with high socio-economic significance and complex pathogenesis. Neuroprotective agents are common used in the treatment of brain injuries, among which substances that affect mitochondrial function are distinguished. This study was devoted to assessing the effect of new perspective correctors of mitochondrial dysfunction of neurons containing a 4-hydroxy-3,5-di-tertbutyl phenyl group on the change in the activity of respiratory chain complexes in animals under conditions of experimental traumatic brain injury. Brain injury was modeled by load free fall in the parietal region of the animal's head. The test substances and the reference (ethylmethylhydroxypyridine succinate) were administered for 7 days after the injury. Changes in cognitive and neurological deficits, as well as the activity of mitochondrial respiratory chain complexes in the mitochondrial fraction of the brain were evaluated. As a result, it was found that the use of the analyzed substances largely than the use of the referent contributed to the restoration of the activity of complexes III–V of the mitochondrial respiratory chain, which eventually led to a decrease in neurological and cognitive deficits. At the same time, the severity of the pharmacological effect did not depend on the type of base scaffold, which was represented by the core of pyrimidine and benz-γ-pyron.

Keywords: traumatic brain injury, neuroprotectors, mitochondrial dysfunction, ethylmethylhydroxypyridine succinate