

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП НА РЕСПИРОМЕТРИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАВМАТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

К.А. Мирошниченко, М.В. Черников

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск,
кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии*

Аннотация. Хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ) является тяжелой нейродегенеративной патологией, развивающейся вследствие неоднократных сотрясений головного мозга, приводящей к инвалидизации и смерти больного. Материалы и методы. Моделирование патологии осуществляли посредством травматического воздействия на теменную область черепа крыс грузом массой 150 г с высоты 50 см в течение 7 дней. Исследуемыми соединениями выступали холина альфосцерат, гопантеновая кислота, аминифенилмасляная кислота, цитруллинмалат, полидигидроксифенилентиосульфат натрия. Результаты. Установлено достоверно значимая нормализация респирометрической функции митохондрий в условиях ХТЭ. Выводы. Проанализировав результаты, предположили наличие церебропротекторного действия у данных средств посредством восстановления респирометрической функции митохондрий клеток головного мозга.

Ключевые слова: хроническая травматическая энцефалопатия, митохондриальная дисфункция.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90062.

THE EFFECT OF DRUGS OF VARIOUS PHARMACOLOGICAL GROUPS ON THE RESPIROMETRIC FUNCTION OF MITOCHONDRIA IN CONDITIONS OF CHRONIC TRAUMATIC ENCEPHALOPATHY

K.A. Miroshnichenko, M.V. Chernikov

*Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of FSBEI HE "Volgograd State Medical University"
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Pyatigorsk,
Department of pharmacology with clinical pharmacology course*

Abstract. Chronic traumatic encephalopathy (CTE) is a severe neurodegenerative pathology that develops as a result of repeated concussions of the brain, leading to disability and death of the patient. Materials and methods. Pathology modeling was carried out by traumatic impact on the parietal region of the rat skull with a weight of 150 g from a height of 50 cm for 7 days. The studied compounds were choline alfoscerate, hopanthenic acid, aminophenylbutyric acid, citrulline malate, and sodium polydihydroxyphenylenethiosulfonate. Results. Significantly significant normalization of mitochondrial respirometric function was found in the conditions of CTE. Conclusions. After analyzing the results, we can assume the presence of a cerebroprotective effect in these drugs by restoring the respirometric function of the mitochondria of brain cells.

Keywords: chronic traumatic encephalopathy, mitochondrial dysfunction.

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-315-90062.

Хроническая травматическая энцефалопатия (ХТЭ) является прогрессирующей патологией головного мозга, развивающейся вследствие воздействия повторяющихся черепно-мозговых травм, посредством первичных и вторичных каскадов повреждения нейронов и глии. Симптомокомплекс данного заболевания представлен когнитивными (снижение памяти,

деменция), сенсомоторными (тремор, атаксия), поведенческими (депрессии, суицидальные проявления) нарушениями, приводящими к снижению качества жизни больных и их окружающих [8]. Одним из ведущих патогенетических механизмов является снижение функциональной активности митохондрий, что стимулирует, в свою очередь, образование энергодефицита,

запускающего каскад реакций, способствующих гибели клеток головного мозга, приводя к развитию клинических проявлений заболевания [7].

Изучение влияния лекарственных средств различных фармакологических групп на респирометрическую функцию митохондрий позволит определить новый вектор для успешной терапии ХТЭ с целью нивелирования дальнейшего прогрессирования заболевания вплоть до инвалидизации и смерти больного [9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить влияние лекарственных средств, а именно: холина альфосцерата, гопантеновой кислоты, аминифенилмасляной кислоты, цитруллинмалата, полидигидроксифенилентиосульфата натрия на респирометрическую функцию митохондрий в условиях ХТЭ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы была выполнена на 70 крысах линии *Wistar* (самцы) с массой 260–290 г, разделенных по 10 особей в каждую группу. Манипуляции, проводимые с животными, строго соответствовали положениям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Моделирование патологии осуществляли посредством прямого травматического воздействия на теменную область черепной коробки крыс на протяжении 7 дней (однократно в сутки). Травмирование вызывали с помощью груза ($m = 0,15$ кг) при контролируемом падении с высоты 0,5 м [5].

Исследуемые лекарственные средства вводили *per os* по прошествии 0,5 ч. после воздействия на протяжении 7 дней. Холина альфосцерат (Церебро, Верофарм, РФ) применяли в дозе 100 мг/кг, гопантеновую кислоту (пантогам, «ПИК-ФАРМА ПРО», РФ) – 100 мг/кг, аминифенилмасляную кислоту (фенибут, «ОлайнФарм», Латвия) – 25 мг/кг, цитруллинмалат (стимол, Biocodex, Франция) – 25 мг/кг, полидигидроксифенилентиосульфат натрия (гипоксен, «Олифен корпорация», Россия) – 25 мг/кг [5, 6].

Животным группы негативного контроля (НК) вводили физиологический раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. На восьмые сутки эксперимента производили забор биоматериала (головной мозг крыс) посредством декапитации под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг). Биоматериал гомогенизировали в среде выделения. Популяцию клеток, содержащую нативные митохондрии, получали при помощи дифференциального центрифугирования.

Последнюю использовали для оценки митохондриальных функций методом респирометрии с применением системы лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, РФ).

В ходе исследования применялся протокол анализа SEAHORSE, согласно которому респирометрическую функцию митохондрий определяли по степени изменения потребления кислорода при введении разобщителей митохондриального дыхания, а именно: олигомицин 1 мкг/мл; 4(трифлуорометок-си)фенил-гидразон)малононитрил (FCCP – 1 мМ); ротенон – 1 мМ. Потребление кислорода измеряли в ppm [10]. Исследуемыми показателями выступали: АТФ-генерирующая способность, максимальный уровень дыхания, респираторная емкость.

При статистической обработке полученных результатов применяли пакет прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, США), сравнение средних значений производили с использованием критерия сравнения Ньюмена – Кейсла.

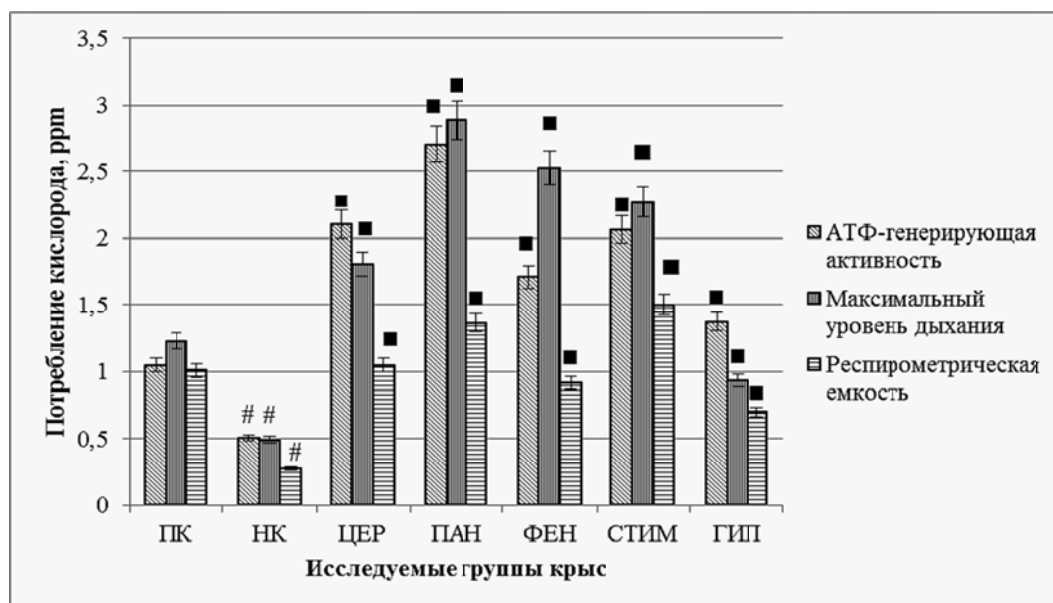
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке респирометрической функции установлено, что АТФ-генерирующая активность у крыс группы положительного контроля (ПК) составила $(1,05 \pm 0,101)$ ppm. В то же время у животных НК данный показатель уменьшился на 107,6 % ($p < 0,05$) относительно крыс группы ПК.

На фоне введения животным в качестве фармакологической поддержки церебро, пантогама, фенибута установлено повышение АТФ-генерирующей способности митохондрий в 3,1 раза ($p < 0,05$), в 4,4 раза ($p < 0,05$), в 2,2 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой крыс НК. При применении животным стимула и гипоксена отмечено увеличение исследуемого показателя в 3,2 раза ($p < 0,05$), на 169 % ($p < 0,05$) по отношению к группе крыс НК.

Определение максимального уровня дыхания показало следующее, что последний у животных ПК группы составил $(1,23 \pm 0,099)$ ppm. У крыс группы НК изучаемый показатель снизился относительно животных ПК на 149 % ($p < 0,05$). При введении церебро, пантогама, фенибута отмечено повышение уровня максимального дыхания в 2,7 раза ($p < 0,05$), 4,8 раза ($p < 0,05$), 4,1 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с крысами группы НК.

На фоне применения стимула и гипоксена установлено увеличение изучаемого показателя относительно группы НК животных в 3,6 раза ($p < 0,05$) и на 88,7 % ($p < 0,05$) соответственно.



Статистически значимо (критерий Ньюмена – Кейса) относительно группы крыс ПК (# $p < 0,05$), относительно животных группы НК (■ $p < 0,05$).

Рис. Влияние изучаемых соединений на респиromетрическую функцию митохондрий в условиях ХТЭ и ее коррекции:

ПК – животные группы положительного контроля; НК – группа крыс негативного контроля;
ЦЕР – группа животных, которым вводили церебро; ПАН – группа крыс, получавшая пантогам;
ФЕН – животные, которым вводили фенибут; СТИМ – крыс группа, получавшая стимул;
ГИП – группа животных, которым вводили гипоксен

В ходе оценки респиromетрической емкости отмечено, что у крыс группы ПК ее значение составило $(1,01 \pm 0,084)$ ppm. У группы животных НК изучаемый показатель сократился в 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с крысами группы ПК. При введении крысам церебро, пантогама, фенибута установлено увеличение респиromетрической емкости относительно группы животных НК в 2,8 раза ($p < 0,05$), в 3,9 раза ($p < 0,05$), в 2,3 раза ($p < 0,05$) соответственно. Также применение стимула и гипоксена позволило добиться повышения изучаемого показателя в 4,4 раза ($p < 0,05$) и в 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно по отношению к крысам группы НК.

Нарушение физиологического уровня функционирования митохондрий стимулирует развитие патологий различных уровней и систем организма, особенно в наиболее энергозатратных органах, которым и является головной мозг [2]. Формируемый при этом энергодифицит запускает каскад реакций, который приводит к неминуемой гибели клеток мозга, к клиническим проявлениям изучаемого заболевания. Применение указанных ранее лекарственных средств позволяет в некоторой степени нормализовать респиromетрическую функцию митохондрий, что выражалось в повышении АТФ-генерирующей активности, максимального уровня дыхания и респиromетрической емкости. Данный эффект обусловлен механизмом

действия изучаемых средств, так, холина альфосцерат – за счет стимулирования холинэргической передачи импульсов [4]. Гопантевая и аминокислоты, воздействуя на ГАМК_B-рецептор-канальный комплекс, нормализуют церебральную гемодинамику [1]. Цитруллин-амалат и полидигидрокси-фенилэтилсульфонат натрия стимулируют функции митохондрий за счет воздействия на ферменты дыхательной цепи [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из результатов исследования, установили, что в условиях моделируемой ХТЭ наблюдается нарушение респиromетрической функции митохондрий, о чем свидетельствует достоверно значимое снижение АТФ-генерирующей активности, максимального уровня дыхания и респиromетрической емкости относительно крыс группы ПК. Уменьшение данных показателей, несомненно, будет способствовать прогрессированию заболевания. Применение изучаемых лекарственных средств позволило благоприятно повлиять на ведущую функцию митохондрий. Полученные данные исследования позволяют предположить наличие у перечисленных ранее соединений церебропротекторной активности в условиях экспериментальной ХТЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронков А.В., Мирошниченко К.А., Поздняков Д.И., Потапова А.А. Изучение церебропротекторного действия препаратов различных фармакологических групп в условиях экспериментальной хронической травматической энцефалопатии // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – № 2 (74). – С. 48–52.
2. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А. и др. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза // Фармация и фармакология. – 2019. – № 7 (1). – С. 20–31.
3. Громова О.А., Захарова И.Н., Торшин И.Ю., и др. О патофизиологической терапии астении у детей препаратами цитруллинмалат // Медицинский совет. – 2017. – № 19.
4. Парфенов В.А. Сосудистые когнитивные расстройства. Применение холина альфосцерата // Нервные болезни. – 2013. – № 2.
5. Слободенюк Т.Ф. Нейропротекторные свойства ноотропов при черепно-мозговой травме в условиях нормобарической гипоксической тренировки // Забайкальский медицинский вестник. – 2017. – № 1. – С. 128–136.
6. Сысоев Ю.И., Оковитый С.В., Узугебунам Б. Влияние нового производного диэтиламиноэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 95–105.
7. Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z., et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease // J Pathol. – 2017. – Vol. 241 (2). – P. 236–250.
8. Miroshnichenko K.A., Chernikov M.V., Pozdnyakov D.I. Pharmacological screening of a potentially effective compound for the treatment of chronic traumatic encephalopathy among new pyrimidine derivatives // Pharmacology OnLine. – 2021. – Vol. 1. – P. 411–425.
9. Pozdnyakov D.I., et al. The administration of the new Pyrimidine Derivative-4-{2-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-Vinyl]-6-Ethyl-4-Oxo-5-Phenyl-4H-Pyrimidine-1-Il} Benzulfamide restores the activity of brain cells in experimental chronic traumatic encephalopathy by maintaining mitochondrial function // Medicina. – 2019. – No. 7 (55). – P. 386.
10. Redmann M., Benavides G.A., Wani W.Y., et al. Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture // Redox Biol. – 2018. – Vol. 17. – P. 59–69.

REFERENCES

1. Voronkov A.V., Miroshnichenko K.A., Pozdnyakov D.I., Potapova A.A. Izucheniye tserebroprotektornogo deystviya preparatov razlichnykh farmakologicheskikh grupp v usloviyakh eksperimental'noy khronicheskoy travmaticheskoy entsefalopatii [Study of the cerebroprotective action of drugs of various pharmacological groups in the conditions of experimental

chronic traumatic encephalopathy]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of Volgograd State Medical University], 2020, no. 2 (74), pp. 48–52. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Nigaryan S.A., et al. Otsenka respirometricheskoy funktsii mitokhondriy v usloviyakh patologiy razlichnogo geneza [Assessment of the respirometric function of mitochondria in conditions of pathologies of various origins]. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and Pharmacology], 2019, no. 7 (1), pp. 20–31. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Gromova O.A., Zakharova I.N., Torshin I.YU., Grishina T.R., Limanova O.A. O patofiziologicheskoy terapii astenii u detey preparatami tsitrullinamalat [On the pathophysiological treatment of asthenia in children with citrullineamalate]. *Meditsinskiy sovet* [Medical advice], 2017, no. 19. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Parfenov V.A. Sosudistyie kognitivnyie rasstroystva. Primeneniye kholina al'fostserata [Vascular cognitive impairment. The use of choline alfoscerate]. *Nervnyie bolezni* [Nervous diseases], 2013, no. 2. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Slobodenyuk T.F. Neyroprotektornyye svoystva nootropov pri cherepno-mozgovoy travme v usloviyakh normobaricheskoy gipoksicheskoy trenirovki [Neuroprotective properties of nootropics in traumatic brain injury under conditions of normobaric hypoxic training]. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik* [Transbaikalian Medical Bulletin], 2017, no. 1, pp. 128–136. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Sysoyev Yu.I., Okovityy S.V., Uzuyegbunam B. Vliyaniye novogo proizvodnogo dietilaminoetanol na vyrazhennost' neurologicheskogo defitsita u kryis posle herepno-mozgovoy travmy [Influence of a new derivative of diethylaminoethanol on the severity of neurological deficit in rats after traumatic brain injury]. *Biomeditsina* [Biomedicine], 2018, no. 2, pp. 95–105. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z., et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*, 2017, vol. 241 (2), pp. 236–250.

8. Miroshnichenko K.A., Chernikov M.V., Pozdnyakov D.I. Pharmacological screening of a potentially effective compound for the treatment of chronic traumatic encephalopathy among new pyrimidine derivatives. *PharmacologyOnLine*, 2021, vol. 1, pp. 411–425.

9. Pozdnyakov D.I., et al. The administration of the new Pyrimidine Derivative-4-{2-[2-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-Vinyl]-6-Ethyl-4-Oxo-5-Phenyl-4H-Pyrimidine-1-Il} Benzulfamide restores the activity of brain cells in experimental chronic traumatic encephalopathy by maintaining mitochondrial function. *Medicina*, 2019, no. 7 (55), p. 386.

10. Redmann M., Benavides G.A., Wani W.Y., et al. Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture. *Redox Biol*, 2018, vol. 17, pp. 59–69.

Контактная информация

Мирошниченко Кирилл Александрович – аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, e-mail: K220436@yandex.ru