

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-7-6-10

АНТИ-АПОПТОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ФОРМИЛХРОМОНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, Э. Т. Оганесян, В. М. Руковицина, М. В. Ларский¹

Изучена анти-апоптотическая активность производных 3-формилхромона в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. Работа выполнена на крысах самцах линии Вистар. Церебральную ишемию воспроизводили по модифицированному методу Tamura. Исследуемые соединения вводили внутрь в дозе 30 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали ресвератрол в дозе 100 мг/кг. В ходе проведения эксперимента определяли следующие параметры: содержание про-апоптотических белков: апоптоз-индуцирующего фактора, цитохрома С, эндонуклеазы G и Smac/DIABLO, латентное время открытия МТР-поры и величину зоны инфаркта мозга. Установлено, что на фоне применения ресвератрола снижается концентрация про-апоптотических маркеров, время открытия МТР-поры на 88,2 % ($p < 0,05$) и величины зоны некроза головного мозга на 36,6 % ($p < 0,05$). Исследуемые производные 3-формилхромона также снижают интенсивность про-апоптотического каскада, латентного времени открытия МТР-поры и зоны церебрального инфаркта: соединение Х3АА — на 31 % ($p < 0,05$), Х3АВ — на 28,3 % ($p < 0,05$), Х3АС — на 27,1 % ($p < 0,05$), Х3АD — на 34,4 % ($p < 0,05$) и Х3АЕ — на 38 % ($p < 0,05$).

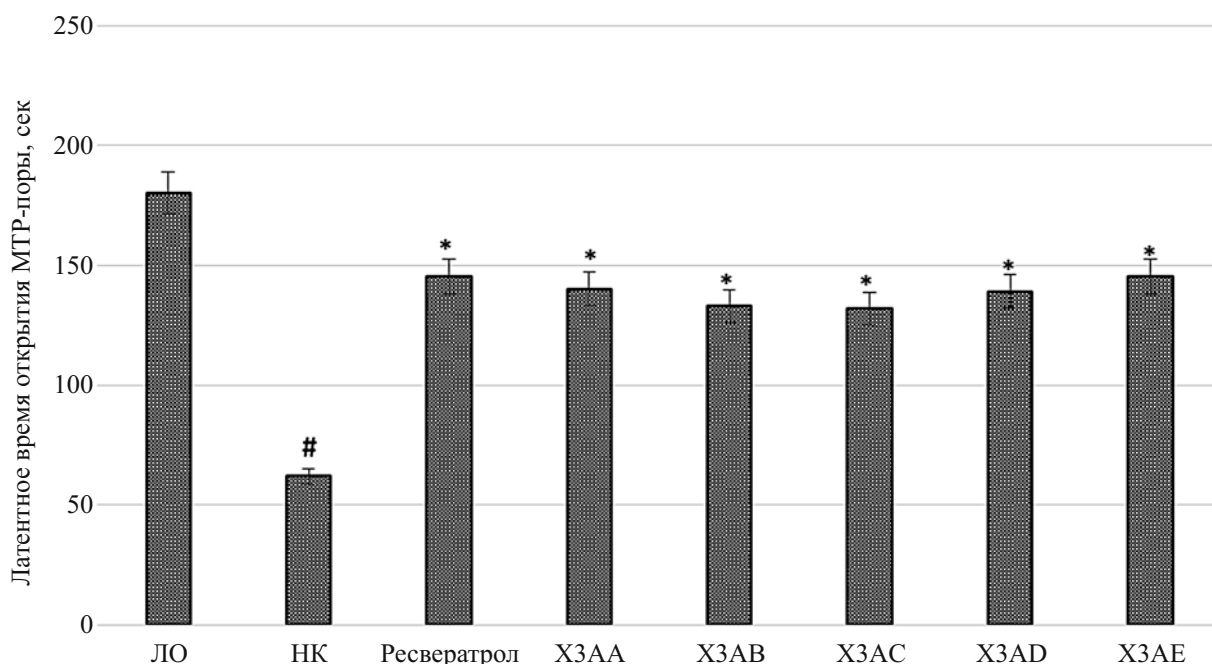
Ключевые слова: ишемия головного мозга; апоптоз; производные хромона.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике ВОЗ, инсульт, наряду с ишемической болезнью сердца и ее осложнениями в виде инфаркта миокарда, а также онкологическими заболеваниями занимает первые позиции среди причин смертности и инвалидности и социальной дезадаптации трудоспособного населения [8]. Несмотря на растущее число случаев геморрагического инсульта, подавляющее большинство острых нарушений мозгового кровообращения приходится на ишемическую форму, частота развития которой составляет не менее 85 % [10]. Как известно, ишемический инсульт возникает в результате закупорки сосуда тромбом, либо эмболом, при этом возникают характерные функциональные и метаболические нарушения, определяющие характер и степень поражения мозговой ткани [6]. К числу метаболических сдвигов, возникающих из-за ограничения церебрального кровотока, относится митохондриальная дисфункция, которая преимущественно проявляется в виде нарушения аэробного метаболизма глюкозы, синтеза АТФ и образовании активных форм кислорода (АФК) [15]. Однако митохондрии могут быть вовлечены не только в процессы генерации АФК и энергообразования, но и могут принимать непосредственное участие в ишемической гибели нейронов. Последняя представляет собой последовательный каскадный процесс перехода от образования про-витальных

к про-летальным белковым факторам, который может занимать от нескольких часов до нескольких дней [5]. При этом, в зависимости от типа зоны ишемического повреждения механизмы клеточной гибели будут различны. В очаге инфаркта головного мозга (ГМ) отмечается, как правило, пассивный неконтролируемый — некротический тип, в то время как в области ишемической пенумбры гибель клетки происходит по апоптотическому механизму — запрограммированному, контролируемому типу [15]. Митохондрии играют существенную роль в инициации и дальнейшем распространении апоптотического каскада. В результате повышенного образования АФК, нарушения электронного тока по дыхательной цепи, митохондриальная мембрана теряет свою целостность и в клетку высвобождается ряд про-апоптотических сигнальных молекул, таких как, цитохром С, апоптоз-индуцирующий фактор (АИФ) и эффекторов — эндонуклеаза G и активатор каспазы Smac/DIABLO [9]. При этом, рядом авторов в качестве “точки невозврата”, после которой инверсия апоптотических реакций невозможна, выделяется процесс формирования МТР-поры (mitochondrial permeability pore) [1], которая, в то же время является потенциальной мишенью для церебропротекторных фармакологических веществ [7]. Ранее для некоторых производных хромон-3-альдегида были установлены анти-апоптотические свойства, выражаемые в подавлении образования АИФ, однако интерес могут представлять и другие аспекты анти-апоптотической активности данного класса соединений [13].

¹ Пятигорский медико-фармацевтического институт — филиал ФГБОУ ВО “Волгоградский государственный медицинский университет”, Россия, 357532, Пятигорск, пр. Калинина, д. 11.



Примечание: во всех случаях $n = 6$; МТП-пора — митохондриальная пора переходной проницаемости; # статистически значимо относительно ЛО группы животных; * статистически значимо относительно НК группы животных.

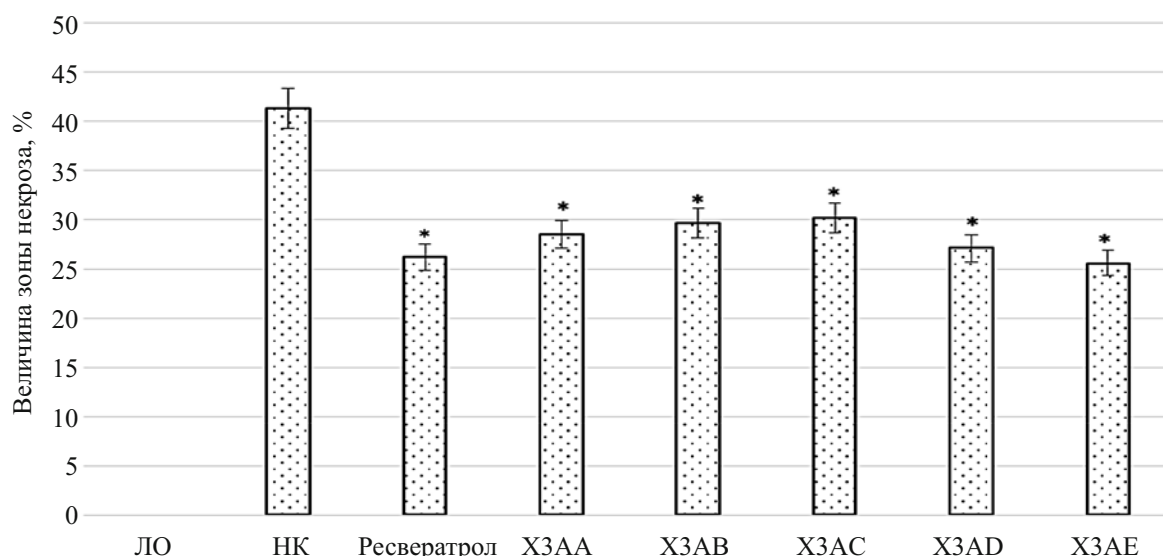
Рис. 1. Изменение латентного времени открытия МТП-поры в супернатанте головного мозга животных на фоне коррекции церебральной ишемии исследуемыми соединениями и ресвератролом.

Цель исследования: оценить анти-апоптотические свойства производных хромон-3-альдегида в условиях экспериментальной ишемии головного мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 96 крысах самцах линии Вистар, массой 210 – 230 г, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово”. На время проведения исследования крысы содержались в контролируемых условиях лаборатории живых систем Пятигорского медико-фармацевтического института и размещались в макролоновых клетках при температуре окружающего воздуха 22 ± 2 °С, относительной влажности 60 ± 5 %, естественной смене суточного цикла. Содержание и все манипуляции, проводимые с животными, соответствовали требованиям международных нормативных документов, регулирующих этические проблемы работы с лабораторными животными. Ишемию ГМ моделировали под хлоралгидратной анестезией (350 мг/кг, внутривенно) методом необратимой правосторонней окклюзии средней мозговой артерии, при этом были сформированы следующие экспериментальные группы ($n = 12$ каждая группа): ложноперированные животные (ЛО); группа крыс негативного контроля (НК); группы животных, получавшие исследуемые соединения, группа крыс, получавшая препарат сравнения. Исследуемые соединения (X3AA — 3-формил хромон; X3AB — 3-[3-(2-гидрокси-4-метокси-фенил)-3-оксо-пропенил]-хромен-4-он;

X3AC — 3-[3-(5-флуоро-2-гидрокси-фенил)-3-оксо-пропенил]-хромен-4-он; X3AD — 3-[3-(2-гидрокси-3-йодо-5-метиил-фенил)-3-оксо-пропенил]-хромен-4-он; X3AE — 4-[(4-оксо-4Н-хромен-3-метилен)-амино]-бензойная кислота) вводили внутрь в дозе 30 мг/кг [13] через 30 мин после воспроизведения церебральной ишемии и далее 1 раз в день на протяжении 72 ч. В качестве препарата сравнения использовали ресвератрол в дозе 100 мг/кг, внутрь (Hunan Warrant Pharmaceuticals, КНР), который согласно литературным данным обладает анти-апоптотической активностью, реализуемой при ишемии ГМ [12]. Ресвератрол вводили по аналогичной исследуемым веществам схеме. На 4-й день после моделирования ишемии крыс декапитировали (под хлоралгидратной анестезией) и извлекали ГМ. У шести животных из группы ГМ гомогенизировали в PBS с pH 7,4 в соотношении 1:7. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течении 5 мин, полученный супернатант удаляли для проведения ИФА. В данной работе методом ИФА определяли концентрацию цитохрома С, АИФ, эндонуклеазы G и белка Smac/DIABLO (использованы видоспецифичные реактивы производства Cloud Clone Corp). Также у крыс оценивали изменение латентного времени открытия МТП-поры методом, основанном на изменении светопоглощения анализируемой смеси при прекращении ингибирующего действия циклоспорина А на открытие МТП-поры [3].



Примечание: во всех случаях $n = 6$; * статистически значимо относительно НК группы животных.

Рис. 2. Изменение зоны некроза головного мозга животных на фоне коррекции церебральной ишемии исследуемыми соединениями и ресвератролом.

У оставшихся животных ($n = 6$) трифенилтетразолиевым методом определяли величину зоны церебрального некроза [1]. Полученные результаты статистически обрабатывали и выражали в виде $M \pm SEM$. Сравнение групп средних осуществляли методом ANOVA с пост-обработкой критерием Ньюмена — Кейсла для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. В работе использовали прикладной пакет статистического анализа STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) для ОС Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у НК группы животных отмечается увеличение концентрации АИФ, цитохрома С, эндонуклеазы G и белка Smac/DIABLO в сравнении с ЛО группой крыс в 14,7 раза ($p < 0,05$); 6,6 раза ($p < 0,05$); 6,0 раз ($p < 0,05$) и 16,7 раза ($p < 0,05$), соответственно (таблица). При этом латентное время открытия МТР-поры (рис. 1) у животных, лишенных фармакологической поддержки уменьшалось по отно-

шению к ЛО крысам в 2,5 раза ($p < 0,05$). Наблюдаемые изменения у крыс группы НК могут свидетельствовать об увеличении активности внутреннего пути апоптоза, что в условиях церебральной ишемии может способствовать повышенной гибели нейронов в зоне “ишемической полутени” и, как следствие, увеличению зоны инфаркта ГМ, которая у НК группы животных составила $41,3 \pm 2,63$ % (рис. 2).

На фоне введения животным ресвератрола отмечено уменьшение концентрации про-апоптотических молекул в супернатанте ГМ. Так, содержание АИФ уменьшилось по отношению к аналогичному показателю крыс группы НК на 33,7 % ($p < 0,05$); цитохрома С — на 26,2 % ($p < 0,05$); эндонуклеазы G и Smac/DIABLO на 29,4 % ($p < 0,05$) и 34 % ($p < 0,05$) соответственно (таблица). В тоже время введение животным ресвератрола в дозе 100 мг/кг сопровождалось снижением (относительно НК группы животных) латентного периода открытия МТР-поры (рис. 1) и зоны церебрального некроза на 88,2 % ($p < 0,05$) и 36,6 % ($p < 0,05$), соответственно.

Изменение концентрации про-апоптотических молекул в супернатанте головного мозга животных на фоне коррекции церебральной ишемии исследуемыми соединениями и ресвератролом

Группа	ЛО	НК	Ресвератрол	X3AA	X3AB	X3AC	X3AD	X3AE
АИФ, нг/мл	1,25 ± 0,256	18,4 ± 0,152 [#]	12,2 ± 1,257*	10,4 ± 0,931*	13,6 ± 0,458*	14,0 ± 1,002*	10,9 ± 0,204*	9,9 ± 0,527 *
Цитохром С, нг/мл	0,64 ± 0,012	4,2 ± 0,124 [#]	3,1 ± 0,012*	2,8 ± 0,261*	2,6 ± 0,074*	2,9 ± 0,098*	3,2 ± 0,210*	2,4 ± 0,015 *
Эндонуклеаза G, пг/мл	425,3 ± 10,267	2562,6 ± 45,261 [#]	1809,5 ± 35,277*	1336,6 ± 63,478*	1498,1 ± 51,185*	1727,2 ± 60,632*	1890,9 ± 45,028*	1424,6 ± 39,126*
Smac/DIABLO, нг/мл	2,31 ± 0,233	38,5 ± 2,561 [#]	25,4 ± 4,150*	27,1 ± 2,274*	28,7 ± 2,673*	27 ± 5,77*	26 ± 2,329*	25,2 ± 2,441 *

Примечание: во всех случаях $n = 6$; [#] статистически значимо относительно ЛО группы животных; * статистически значимо относительно НК группы животных.

Применение исследуемых соединений — производных хромон-3-альдегида оказало положительное действие на течение реакций внутреннего, митохондриального пути апоптоза, что отразилось в уменьшении концентрации ключевых молекул, запускающих и поддерживающих данный каскад реакций. Так на фоне введения крысам соединения ХЗАА наблюдалось снижение содержания АИФ, цитохрома С, эндонуклеазы G и Smac/DIABLO, по сравнению с аналогичными показателями крыс группы НК на 43,5; 33,3, 47,8 и 29,6 %, соответственно, ($p < 0,05$). Стоит отметить, что подобная тенденция отмечена и при применении остальных изучаемых производных хромон-3-альдегида. На фоне введения веществ ХЗАВ, ХЗАС, ХЗАD и ХЗАЕ наблюдали снижение концентрации АИФ на 26,1; 23,9; 40,8 и 46,2 %, соответственно, ($p < 0,05$). В тоже время содержание цитохрома С в супернатанте ГМ животных, получавших соединения ХЗАВ, ХЗАС, ХЗАD и ХЗАЕ снизилось по отношению к НК группе крыс на 38,1; 31; 23,8 и 42,9 %, соответственно, ($p < 0,05$). Концентрация эндонуклеазы G у животных на фоне применения веществ под лабораторными шифрами ХЗАВ, ХЗАС, ХЗАD и ХЗАЕ уменьшилась на 41,5; 32,6; 26,2 и 44,4 %, соответственно, ($p < 0,05$), при этом содержание белка Smac/DIABLO при введении животным данных соединений снизилось на 25,5; 29,9; 32,5 и 34,5 %, соответственно, ($p < 0,05$) (таблица).

Оценивая изменение латентного времени открытия МТР-поры у крыс, получавших исследуемые соединения, отмечено увеличение данного параметра по отношению к животным, лишенным фармакологической поддержки. Так, на фоне применения соединения ХЗАА время, необходимое на формирование МТР-поры было на 77,3 % ($p < 0,05$) выше, по сравнению с аналогичным показателем крыс НК группы, в тоже время при введении животным веществ ХЗАВ, ХЗАС, ХЗАD и ХЗАЕ отмечено увеличение (относительно НК группы) латентного времени открытия МТР-поры на 61,2; 59,6; 80,3 и 90,9 %, соответственно, ($p < 0,05$).

Описанные выше изменения в системе реакций митохондриального пути апоптоза могут лежать в основе уменьшения величины зоны некроза ГМ на фоне применения исследуемых производных хромон-3-альдегида. Так, при введении животным соединений ХЗАА, ХЗАВ, ХЗАС, ХЗАD и ХЗАЕ очаг церебрального инфаркта снизился относительно показателя НК группы животных на 31; 28,3; 27,1; 34,4 и 38 %, соответственно, ($p < 0,05$).

Анти-апоптотическое действие биологически активных веществ может являться одной из существенных составляющих церебропротективной активности. Р. С. Waldmeier показал, что применение средств, подавляющих про-апоптотический каскад, препятствовало поражению мозговой ткани в условиях различного поражения ГМ, включая церебральную ишемию, черепно-мозговую травму и нейродегенеративные за-

болевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз) [14].

В связи с этим было проведено исследование, посвященное изучению потенциальных анти-апоптотических свойств у ряда соединений, представляющих собой производные 3-формилхромона. В результате было установлено, что на фоне применения изучаемых соединений существенно снижалось содержание про-апоптотических молекул в супернатанте ГМ животных. При применении изучаемых производных хромон-3-альдегида отмечено уменьшение латентного времени формирования МТР-поры и зоны церебрального инфаркта. Анти-апоптотическое действие соединений 3-формилхромонного ряда может быть связано с подавлением формирования МРР-поры (что было установлено в данном исследовании), а также, вероятно, за счет подавления образования свободных радикалов [2], которые являются одним из триггерных апоптотических факторов [10], и хелатирующих свойств, направленных на связывание двухвалентных ионов [2], прежде всего Ca^{2+} , запускающего внутренний путь апоптоза [11].

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная ишемия головного мозга сопровождается увеличением интенсивности апоптотических реакций, о чем свидетельствует повышение содержания АИФ, цитохрома С, эндонуклеазы G и Smac/DIABLO в 14,7 раза ($p < 0,05$); 6,6 раза ($p < 0,05$); 6 раз ($p < 0,05$) и 16,7 раза ($p < 0,05$), а также снижение латентного времени открытия МТР-поры в 2,5 раза ($p < 0,05$) у животных, не получавших фармакологических веществ.

2. Применение ресвератрола в дозе 100 мг/кг способствовало уменьшению концентрации про-апоптотических маркеров, времени открытия МТР-поры на 88,2 % ($p < 0,05$) и величины зоны некроза головного мозга на 36,6 % ($p < 0,05$).

3. На фоне введения исследуемых производных 3-формилхромона отмечено снижение интенсивности про-апоптотического каскада, латентного времени открытия МТР-поры и зоны церебрального инфаркта: при применении соединения ХЗАА — на 31 % ($p < 0,05$), ХЗАВ — на 28,3 % ($p < 0,05$), ХЗАС — на 27,1 % ($p < 0,05$), ХЗАD — на 34,4 % ($p < 0,05$) и ХЗАЕ — на 38 % ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, С. А. Нигарян, *Фармация и фармакол.*, 7(6), 332–339 (2019); doi: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-332-338
2. А. В. Воронков, Д. И. Поздняков, В. М. Руковицина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, 82(12), 32–35 (2019); doi: ???
3. В. И. Жилюк, В. И. Мамчур, С. В. Павлов, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 78(2), 10–14 (2015).
4. P. Bernardi, A. Rasola, M. Forte, et al.. *Physiol. Rev.*, 95(4), 1111–1155 (2015); doi: 10.1152/physrev.00001.2015

5. M. Fang, J. Li, S. C. Tiu, L. Zhang, et al., *J. Neurosci. Res.*, **81**, 269 – 274 (2005).
6. R. L. Jayaraj, S. Azimullah, R. Beiram, et al., *J. Neuroinflammation*, **16**(1), 142 (2019); doi: 10.1186/s12974-019-1516-2
7. K. Kalani, S. F. Yan, S. S. Yan, *Drug Discov. Today*, **23**(12), 1983 – 1989 (2018); doi: ???
8. T. Lallukka, J. Ervasti, E. Lundström, et al., *J. Am. Heart Assoc.*, **7**(1), e006991 (2018). doi: 10.1161/JAHA.117.006991
9. K. Niizuma, H. Yoshioka, H. Chen, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**(1), 92 – 99 (2010); doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.002
10. S. A. Rammal, M. A. Almekhlafi, J. Taibah *University Med. Sci.*, **11**(4), 295 – 300 (2016); doi: 10.1016/j.jtumed.2016.05.001
11. J. Sun, Y. Z. Li, Y. Ding, et al., *Brain Res.*, **1589**, 126 – 139 (2014); doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.039
12. F. C. Sureda, A. Ester, V. Carme, et al., *Cur. Pharm. Design*, **17**, 230 – 245 (2011); doi: 10.2174/138161211795049732
13. A. V. Voronkov, D. I. Pozdnyakov, V. M. Rukovitsyna, et al., *Pharmacology online*, **1**, 429 – 437 (2019).
14. P. C. Waldmeier, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **27**(2), 303 – 321 (2003); doi: ???
15. J. L. Yang, S. Mukda, S. D. Chen, *Redox Biol.*, **16**, 263 – 275 (2018); doi: 10.1016/j.redox.2018.03.002

Поступила 11.04.20

ANTI-APOPTOTIC ACTIVITY OF 3-FORMYLCHROMONE DERIVATIVES UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA

A. V. Voronkov¹, D. I. Pozdnyakov¹, E. T. Oganessian¹, V. M. Rukovitsina¹, and M. V. Larskii¹

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, prosp. Kalinina 11, Pyatigorsk, 357532 Russia.

The anti-apoptotic activity of 3-formylchromone derivatives under experimental cerebral ischemia conditions was evaluated on male Wistar line rats with the model damage reproduced according to the modified Tamura method. Test compounds were administered per os at a dose of 30 mg/kg. Resveratrol at a dose of 100 mg/kg was used as the reference. During the experiment, the following parameters were determined: content of pro-apoptotic proteins such as AIF, cytochrome C, endonuclease G and Smac/DIABLO; latent time of opening of the mitochondrial pore transition permeability; and size of the cerebral infarction zone. It was found that, with the use of resveratrol, the concentration of pro-apoptotic markers drops, the opening time of the mitochondrial pore transition permeability decreases by 88.2% ($p < 0.05$) and the size of brain necrosis zone decreases by 36.6% ($p < 0.05$). Administration of the test derivatives of 3-formylchromone decreases the intensity of the pro-apoptotic cascade, latent time of opening of the mitochondrial pore transition permeability and cerebral infarction zone for compound X3AA by 31% ($p < 0.05$), for X3AB by 28.3% ($p < 0.05$), for X3AC by 27.1% ($p < 0.05$), for X3AD by 34.4% ($p < 0.05$) and for X3AE by 38% ($p < 0.05$).

Keywords: cerebral ischemia; apoptosis; chromon derivatives.