

# ИССЛЕДОВАНИЕ ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ЛИПОСОМЫ ИНГИБИТОРА ГЛИКОЛИЗА МОНОЙОДАЦЕТАТА В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА НА МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЛЬЮИС

## Е.Е. Буйко

аспирант,

Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, Томский политехнический университет (г. Томск)

E-mail: buykoevgen@yandex.ru

## Д.А. Коршунов

к.м.н, науч. сотрудник, лаборатория биохимии опухолей,

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (г. Томск)

E-mail: ieved@ya.ru

## И.В. Кондакова

д.м.н., зав. лабораторией биохимии опухолей,

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (г. Томск)

E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

**Актуальность.** Достижения в понимании молекулярных механизмов, связанных с эффектом Варбурга, стали основой для создания новых специфических антигликолитических агентов. Несмотря на их успешные доклинические испытания, многие новые противоопухолевые средства на основе ингибиторов гликолиза потерпели неудачу в клинических исследованиях, продемонстрировав системную токсичность. Эффективным подходом снижения системной интоксикации является адресная доставка лекарств с помощью липосом. Однако существуют технические сложности получения липосом для низкомолекулярных соединений, к которым относятся ингибиторы гликолиза, а также эффективности доставки к опухоли в силу особенностей биораспределения и фармакокинетики липосом.

**Цель работы.** Оценить противоопухолевый и антиметастатический эффекты у ингибитора гликолиза монойодацетата, погруженного в липосомы.

**Материал и методы.** Оценку терапевтического действия антиметаболита выполняли на мышах линии C57BL/6j, используя модель карциномы легких Льюис. В качестве референтного препарата применяли метотрексат. Липосомы получали методом экструзии. Готовые липосомы очищали от не включенного компонента методом диализа. Липосомы вводили через хвостовую вену.

**Результаты.** Торможение роста первичной опухоли в случае применения монойодацетата в самостоятельной форме было сопоставимо с действием метотрексата, достигая в среднем 15%. При лечении липосомальными формами монойодацетата индекс торможения роста повышался до 25%. Торможение роста метастазов в легких мышей при применении и монойодацетата, и метотрексата оказалось сильнее действия препаратов на первичный очаг. Средний показатель в этих леченых группах составил 65%. Липосомальная форма монойодацетата, в отличие от аналогичной формы метотрексата, достоверно не тормозила рост метастазов.

**Выводы.** Липосомальные формы монойодацетата сильнее тормозят рост первичного очага в сравнении с их действием в самостоятельной форме, но при этом в результате изменения биораспределения уменьшается антиметастатический эффект.

**Ключевые слова:** монойодацетат, метотрексат, липосомальные лекарственные формы, противоопухолевый эффект.

**Для цитирования:** Буйко Е.Е., Коршунов Д.А., Кондакова И.В. Исследование инкапсулированного в липосомы ингибитора гликолиза монойодацетата в качестве противоопухолевого агента на модели карциномы легких Льюис. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(6):45–49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-06-08>

Разработка новых подходов лечения, которые имели бы избирательную направленность в отношении опухолевых клеток с минимальным воздействием на здоровые ткани, по-прежнему, остается серьезной проблемой онкологии [1]. Одним из наиболее важных метаболических изменений в злокачественных опухолевых клетках является

формирование эффекта Варбурга, воздействие на который можно рассматривать как один из ключевых моментов противоопухолевой терапии [2, 3]. Достижения в понимании сложных клеточных и молекулярных механизмов, связанных с эффектом Варбурга, стали основой для создания новых селективных и специфических агентов, некоторые из ко-

торых в настоящее время дошли до клинических испытаний. При этом одна из ключевых проблем, связанных с агентами, вводимыми в гликолиз опухоли, заключается в том, что они вшиваются в метаболизм нормальных клеток, гликолитическая активность которых также является основополагающей [4]. Несмотря на успешные доклинические испытания, многие новые противоопухолевые средства, относящиеся к ингибиторам гликолиза, потерпели неудачу в I или II фазе клинических исследований, продемонстрировав системную токсичность [5]. Такая ситуация требует поиска селективных антигликолитических агентов с низкой токсичностью или использования методов, которые снижали бы побочные токсические эффекты.

Одним из подходов для снижения системного токсического действия и увеличения терапевтического индекса является адресная доставка лекарств с помощью липосом [6]. Существует множество технологий получения липосомальных форм препаратов. Каждая из них имеет свои преимущества и недостатки [7]. Ключевая проблема получения липосом заключается в использовании температур в пределах 70–80 °С и выше. Это связано с тем, что прохождение через поры мембраны тем лучше, чем выше текучесть липидов. Последняя, в свою очередь, зависит от температуры. В результате этой технической особенности до недавнего времени на рынке среди противоопухолевых препаратов был представлен в липосомальной форме лишь доксорубин, выдерживающий высокие температурные перепады [6].

Среди известных ингибиторов гликолиза можно выделить ряд соединений, которые обладают потенциально высокой синергией с липосомами в силу их индивидуальных свойств. В частности, такой ингибитор, как моноиодацетат обладает в большей степени кардиотоксичностью, которую можно значительно снизить, используя липосомальную форму препарата, за счет изменения биораспределения [8].

**Ц е л ь р а б о т ы** – оценить противоопухолевый и антиметастатический эффекты у моноиодацетата, погруженного в липосомы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Оценку терапевтического действия антиметаболита проводили на мышах линии С57BL/6j (самцы) массой 25–30 г, полученных из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины

имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра. Исследования выполняли с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3 96 и ГОСТ Р 51000.4 96), международных рекомендаций «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Strasburg, 1986 г.).

Для перевивки карциномы Льюис (LLC) всем животным одновременно инокулировали в мышцу бедра по 1,5 млн опухолевых клеток LLC в 0,2 мл 0,9% NaCl. Объем бедра измеряли штангенциркулем.

В исследовании противоопухолевого действия ингибиторов гликолиза использовали моноиодацетат (Sigma Aldrich, США). Референтным препаратом служил метотрексат (Эбеве Фарма, Австрия). Для получения эмульсии полых липосом применяли 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и холестерол (Chol) (Sigma Aldrich, Япония). Использовали следующие молярные соотношения липидов: DPPC : Chol = 9 : 0,02. Ингибитор гликолиза моноиодацетат или метотрексат помещали в камеру экструдера, содержащую эмульсию липосом. Суспензию эмульсии липидных пленок и препаратов пропускали 12 раз через поликарбонатные фильтры диаметром 100 нм (Sartorius, Германия) при температуре 45–60 °С в экструдере и давлении аргона в диапазоне от 2 до 10 МПа. Полученные липосомы очищали от не включенного компонента с помощью мембраны для диализа (ROTH, США).

Препараты в липосомальной форме вводили в хвостовую вену в течение трех дней в максимальной переносимой дозе. В самостоятельной форме препараты животным вводили внутривенно. Лечение животных начинали при достижении размеров опухоли 500 мм<sup>3</sup> и колебании среднего объема в группе не более 10% (шестые сутки от момента инокуляции опухолевых клеток). Контрольные животные получали пустые липосомы или физиологический раствор в том же объеме. Животных выводили из опыта на 21-е сутки эксперимента при токсической дозе золетила (VIRBAC, Франция).

Торможение роста опухоли (ТРО) вычисляли по формулам:

$$\text{ТРО}_v = \frac{(S_k - S_{\text{оп}}) \times 100\%}{S_k},$$

где  $S_k$  и  $S_{оп}$  – средний объем опухоли в контрольной и опытной группах соответственно;

$$TPO_M = \frac{(N_k - N_{оп}) \times 100\%}{N_k},$$

где  $N_k$  и  $N_{оп}$  – средняя масса опухоли в контрольной и опытной группах соответственно.

Уровень торможения метастазов (ТМ) в легких рассчитывали по формуле

$$TM = \frac{(M_k - M_{оп}) \times 100\%}{M_k},$$

где  $M_k$  и  $M_{оп}$  – средняя масса метастазов в легких контрольной и опытной группах соответственно [9].

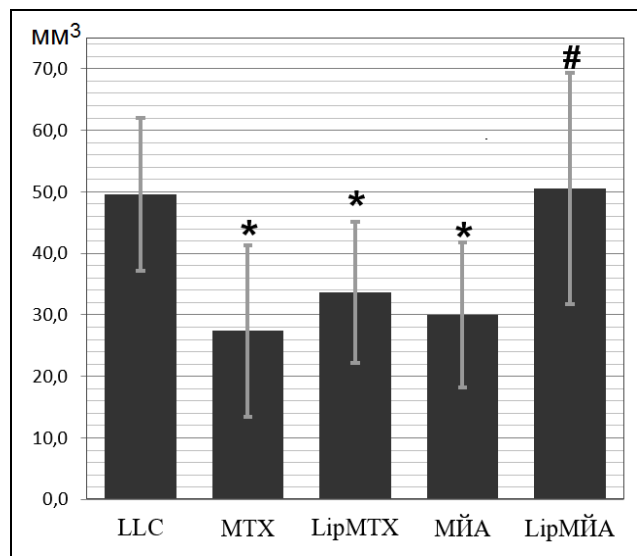
Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки фармакологического действия препарата предварительно проведен поиск максимальной переносимой дозы (МПД) животными для исследуемых препаратов. Оказалось, что МПД в случае применения ингибитора гликолиза моноиодацетата у животных с привитой опухолью вдвое меньше таковой, чем у интактных мышей линии C57BL/6j и составила 9 мг/кг. При введении моноиодацетата мышам в МПД 18 мг/кг для ин-

тактных животных на фоне опухолевого процесса летальность в группе увеличивалась до 100%. При введении метотрексата изменение МПД у животных с привитой опухолью не наблюдалось, МПД составила 6 мг/кг [10].

Результаты эксперимента о противоопухолевом действии моноиодацетата и его липосомальной формы приведены в таблице и на рисунке.



Площадь метастазов в легких мышей на 21-е сутки: MTX – при введении метотрексата в течение трех дней в МПД; LipMTX – при терапии липосомальной формой метотрексата; MIA – при введении моноиодацетата в течение трех дней в МПД; LipMIA – на фоне терапии липосомальной формой моноиодацетата (\* – достоверное отличие от нелеченой группы,  $p < 0,05$ ; # – достоверное отличие от группы MTX,  $p < 0,05$ )

### Динамика торможения роста опухоли первичной опухоли относительно роста нелеченой группы

Группа	Сутки					
	2-е	3-и	4-е	5-е	6-е	7-е
MTX, %	29,7 <sup>1</sup>	11,0 <sup>1</sup>	19,2 <sup>1</sup>	16,9 <sup>1</sup>	7,0 <sup>1</sup>	17,7 <sup>1</sup>
LipMTX, %	20,8 <sup>1,2</sup>	0,9 <sup>2</sup>	9,0 <sup>1,2</sup>	23,8 <sup>1,2</sup>	11,5 <sup>1</sup>	25,7 <sup>1,2</sup>
MIA, %	3,0 <sup>2,3</sup>	5,0 <sup>2</sup>	-0,6 <sup>2,3</sup>	12,3 <sup>1,2,3</sup>	5,8	16,0 <sup>1,3</sup>
LipMIA, %	8,9 <sup>1,2,3</sup>	4,2 <sup>2</sup>	12,7 <sup>1,2,4</sup>	25,4 <sup>1,2,4</sup>	9,6 <sup>1</sup>	25,0 <sup>1,2,4</sup>

Примечание: MTX – динамика роста опухоли при введении метотрексата в течении трех суток в МПД; LipMTX – противоопухолевая терапия липосомальной формой метотрексата; MIA – динамика роста опухоли при введении моноиодацетата в течении трех суток в МПД; LipMIA – динамика роста опухоли на фоне липосомальной формы моноиодацетата; <sup>1</sup> – достоверное отличие от нелеченой группы ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – достоверное отличие от группы MTX ( $p < 0,05$ ); <sup>3</sup> – достоверное отличие от группы LipMTX ( $p < 0,05$ ); <sup>4</sup> – достоверное отличие от группы MIA ( $p < 0,05$ ).

Как видно из результатов, эффективность ТРО ингибиторов моноиодацетата достигало максимум 15% к концу эксперимента и было сопоставимо с действием метотрексатана конечном этапе. Наибольший терапевтический эффект метотрексата наблюдался на начальных этапах с момента введения препарата, однако в дальнейшем он снижался.

Липосомальные формы показали иную динамику. Так, эффективность противоопухолевого эффекта моноиодацетата выросла до 25%. В целом терапевтический эффект оставался стабильным на протяжении всего времени наблюдения.

В случае с референтным препаратом метотрексатом картина изменилась диаметрально в противоположную сторону. В отличие от его самостоятельной формы, противоопухолевый эффект имел нарастающий вектор от начала терапии. При этом для липосомальной формы метотрексата было выявлено увеличение токсичности, гибель животных составила 25%.

Антиметастатическая активность у ингибиторов оказалось различной. Уровни торможения метастазов в легких у моноиодацетата и метотрексата оказались сильнее действия препаратов на первичный очаг. Средний показатель в обеих леченых группах составил 65%. (рисунок). Липосомальная форма моноиодацетата в отличие от метотрексата достоверно не тормозила рост метастазов.

## ВЫВОДЫ

Исследование показало, что моноиодацетат обладает в достаточной степени противоопухолевой активностью на модели карциномы легких Льюис. Максимально переносимая доза моноиодацетата оказалась выше в самостоятельной форме при том же уровне терапевтической активности химиопрепарата метотрексата, что указывает на лучшую переносимость и безопасность ингибито-

ра гликолиза. В липосомальной форме противоопухолевое действие моноиодацетата, возможно за счет биораспределения, изменилось – снизилась антиметастатическая активность и увеличилось торможение роста первичного очага опухоли.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Afroze Alam, Farooq U., Ruchi Singh, Dubey V.P., Shailendra Kumar et al.* Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. *Open Acc. J. of Toxicol.* 2018; 2: 555–600.
2. *Hanahan D., Weinberg R.A.* Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646–674.
3. *Коршунов Д.А., Шашова Е.Е., Кондакова И.В.* Современные представления о метаболическом перепрограммировании в злокачественных новообразованиях. *Биохимия.* 2019; 84: 1385–1400.
4. *Коршунов Д.А., Петрова З.В., Кондакова И.В.* Противоопухолевые мишени в гликолитическом метаболизме злокачественных новообразований. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина.* 2014; 25: 35–42.
5. *Amoedo N.D., Obre E., Rossignol R.* Drug discovery strategies in the field of tumorenergy metabolism: Limitation by metabolic flexibility and metabolic resistance to chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017; 1858: 674–685.
6. *Li Z., Tan S., Li S., Shen Q., Wang K.* Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol. Rep.* 2017; 38: 611–624.
7. *Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* 2013; 8: 102.
8. *Abe H.* Regulation of Cardiac Function: Molecular, Cellular and Pathophysiological Aspects. Tokyo: Japan scientific society press. 1984. 330 p.
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* Под ред. *А.Н. Миронова.* М.: Гриф и К, 2013. 944 с.
10. *Коршунов Д.А., Климов И.А., Иванов В.В., Кондакова И.В.* Исследование ингибиторов гликолиза моноиодацетата и 2-дезоксиглюкозы в качестве противоопухолевых агентов в эксперименте на модели карциномы легких Льюис. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018; 165: 644–647.

Поступила после доработки 5 мая 2020 г.

# STUDY OF LIPOSOME ENCAPSULATED MONOACETATE GLYCOLYSIS INHIBITOR AS AN ANTITUMOR AGENT IN A LEWIS LUNG CARCINOMA MODEL

© Authors, 2020

**E.E. Buyko**

Post-graduate Student, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University (Tomsk)

E-mail: buykoevgen@yandex.ru

**D.A. Korshunov**

Ph.D. (Med.), Research Scientist,

Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk)

E-mail: ieved@ya.ru

**I.V. Kondakova**

Dr.Sc. (Med.), Head of Laboratory of Tumor Biochemistry,  
Cancer Research Institute of National Research Medical Center (Tomsk)  
E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

**Background.** Advances in understanding the molecular mechanisms associated with the Warburg effect have become the basis for the creation of new specific anti-glycolytic agents. Despite their successful preclinical trials, many new anticancer agents based on glycolysis inhibitors have failed in clinical trials, demonstrating systemic toxicity. An effective approach to reducing systemic intoxication is targeted drug delivery using liposomes. However, there are technical difficulties in obtaining liposomes for low molecular weight compounds, which include glycolysis inhibitors, as well as the efficiency of delivery to the tumor due to the peculiarities of liposome bio-distribution and pharmacokinetics.

**Aims.** To evaluate the antitumor and antimetastatic effects of a monoiodoacetate glycolysis inhibitor immersed in liposomes.

**Material and methods.** The therapeutic effect of antimetabolite was evaluated in C57BL/6j mice using a Lewis lung carcinoma model. Methotrexate was used as a reference preparation. Liposomes were obtained by extrusion. Ready liposomes were purified from the not included component by dialysis methods. Liposomes were injected through the tail vein.

**Results.** The inhibition of the growth of the primary tumor in iodoacetate in an independent form was comparable with the effect of methotrexate, reaching an average of 15%. Treating with liposomal forms of iodoacetate increased the growth inhibition index to 25%. Inhibition of the growth of lung metastases in iodoacetate and methotrexate was stronger than the effect of drugs on the primary tumor. The averages in these treated groups were 65%. The liposomal form of iodoacetate, in contrast to the similar form of methotrexate, did not significantly inhibit the growth of metastases.

**Conclusions.** Liposomal forms of iodoacetate inhibit the growth of the primary focus more strongly in comparison with their independent action, however, as a result of changes in biodistribution, the antimetastatic effect decreases.

**Key words:** *iodoacetate, methotrexate, liposomal dosage forms, antitumor effect.*

**For citation:** Buyko E.E., Korshunov D.A., Kondakova I.V. Study of liposome encapsulated monoacetate glycolysis inhibitor as an antitumor agent in a Lewis lung carcinoma model. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(6):45–49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-06-08>

**REFERENCES**

1. Afroze Alam, Farooq U., Ruchi Singh, Dubey V.P., Shailendra Kumar et al. Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. Open Acc. J. of Toxicol. 2018; 2: 555-600.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144: 646-674.
3. Korshunov D.A., Shashova E.E., Kondakova I.V. Sovremennye predstavleniya o metabolicheskom pereprogrammirovani v zlokachestvennyh novoobrazovaniyah. Biohimija. 2019; 84: 1385-1400.
4. Korshunov D.A., Petrova Z.V., Kondakova I.V. Protivoopuholevye misheni v glikoliticheskom metabolizme zlokachestvennyh novoobrazovaniy. Vestnik RONC im. N.N. Blohina. 2014; 25: 35-42.
5. Amoedo N.D., Obre E., Rossignol R. Drug discovery strategies in the field of tumorenergy metabolism: Limitation sbymetabolic flexibility and metabolic resistance to chemotherapy. Biochim. Biophys. Acta. 2017; 1858: 674-685.
6. Li Z., Tan S., Li S., Shen Q., Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). Oncol. Rep. 2017; 38: 611-624.
7. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Res. Lett. 2013; 8: 102.
8. Abe H. Regulation of Cardiac Function: Molecular, Cellular and Pathophysiological Aspects. Tokyo: Japan scientific societi espress. 1984. 330 p.
9. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv. Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K, 2013. 944 s.
10. Korshunov D.A., Klimov I.A., Ivanov V.V., Kondakova I.V. Issledovanie ingibitorov glikoliza monojodacetata i 2-dezokigljukozy v kachestve protivopuholevyh agentov v jeksperimente na modeli karcinomy legkih L'juis. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2018; 165: 644-647.

# ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

## Д.И. Поздняков

к.фарм.н., зав. лабораторией живых систем, доцент,  
кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

## Д.С. Золотых

к.фарм.н., доцент,  
кафедра аналитической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
E-mail: metranidazol@mail.ru

## М.В. Ларский

к.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
E-mail: pharmacemistry@mail.ru

**Актуальность.** Митохондриальная дисфункция является значимым патогенетическим механизмом ишемического поражения головного мозга и перспективной фармакотерапевтической мишенью церебропротективной терапии.

**Цель исследования.** Изучить влияние 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты на изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в супернатанте головного мозга у крыс в условиях церебральной ишемии.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на крысах самцах линии Wistar, которым воспроизводили ишемию головного мозга по методу Тамуга. Крысам вводили 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричную кислоту в дозе 100 мг/кг (*per os*) через 30 мин после ишемии и далее однократно в день на протяжении трех суток. На четвертый день в супернатанте головного мозга методом респиromетрии оценивали изменение активности митохондриальных комплексов I, II, IV и V.

**Результаты.** На фоне введения животным 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты отмечалось увеличение активности митохондриальных комплексов: НАДН-дегидрогеназы; сукцинатдегидрогеназы; цитохром С-оксидазы; F1F0 АТФ-синтазы по отношению к животным, не получавшим фармакологическую поддержку, на 71% ( $p < 0,05$ ); 86% ( $p < 0,05$ ); в 2,29 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. По величине терапевтической эффективности изучаемая 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричная кислота превосходила препарат сравнения – янтарную кислоту в эквивалентной дозе.

**Выводы.** На основании полученных результатов можно предполагать, что 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричная кислота оказывает церебропротекторное действие за счет восстановления митохондриальной функции и устранения энергетического дефицита, возникающего в зоне ишемической пенумбры.

**Ключевые слова:** ишемия головного мозга, митохондриальная дисфункция, производные коричной кислоты.

**Для цитирования:** Поздняков Д.И., Золотых Д.С., Ларский М.В. Влияние производного коричной кислоты на изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи в условиях экспериментальной ишемии головного мозга. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(6):50–54. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-06-09>

Ишемический инсульт представляет собой гетерогенный клинический синдром, в основе которого лежит окклюзия церебральных артерий тромбом, либо эмболом. На сегодняшний день инсульт ишемического типа занимает одно из ведущих мест в структуре смертности и первичной инвалидности населения [1]. В общемировом масштабе приблизительно 80–85% cerebrovasкулярной патологии приходится на ишемический инсульт, при этом порядка 80%, перенесших данное состояние, не способны возобновить трудовую де-

ятельность и подвержены социальной дезадаптации [2]. Поскольку основной причиной развития ишемического инсульта является окклюзия мозговых артерий, характер метаболических и функциональных нарушений, возникающих при нарушении мозгового кровотока и недостатке кислорода, во многом определяют размер зоны ишемического инфаркта мозга и характер клинических проявлений инсульта [3].

На сегодняшний день установлено, что первоочередной причиной метаболического сдвига,

наблюдаемого при манифестации инсульта, является нарушение функциональной активности митохондрий в зоне ишемической «пенумбры» [4], сопровождаемое активацией реакций каспаза-зависимого и каспаза-независимого апоптоза, окислительного стресса, а также уменьшением образования макроэргических соединений, что в свою очередь может способствовать усилению некротических процессов в мозговой ткани [5]. При этом установлено, что в большинстве случаев развития митохондриальной дисфункции дефект, приводящий к нарушению функциональной активности митохондрий, локализуется на уровне комплексов митохондриальной дыхательной цепи: НАДН-дегидрогеназы (комплекс I); сукцинатдегидрогеназы (комплекс II); убихинол-цитохром С оксидоредуктазы (комплекс III); цитохром С-оксидазы (комплекс IV); F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> АТФ-синтазы (комплекс V) [6].

В связи с этим можно предположить, что коррекция митохондриальной дисфункции является перспективным направлением целенаправленной патогенетической терапии инсульта. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что применение 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты (лабораторный шифр АТАСЛ) в условиях ишемии головного мозга способствовало повышению синтеза АТФ, однако механизм реализации данного эффекта до конца не был установлен [7].

Цель исследования – изучение влияния соединения АТАСЛ на изменение активности митохондриальных комплексов у крыс в условиях церебральной ишемии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 200–240 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» и содержащихся в стандартных условиях вивария. Концепция исследования одобрена локальным этическим комитетом (протокол № 5 от 27.02.2020). Ишемию головного мозга моделировали методом правосторонней необратимой окклюзии средней мозговой артерии по методу Tamura (1981 г.) [8]. Животные были распределены на четыре группы по 10 особей:

- 1) ложнооперированные животные (ЛО);
- 2) крысы негативного контроля (НК) с воспроизведенной ишемией, но лишённые фармакологической поддержки;
- 3) животные, получавшие референтный препарат – янтарную кислоту в дозе 100 мг/кг;

4) крысы, которым вводили соединение АТАСЛ в дозе 100 мг/кг [7].

Препарат сравнения и исследуемое соединение вводили *per os* в виде тонкодисперсной водной суспензии (приготавливалась непосредственно перед введением без использования вспомогательных веществ) через 30 мин после операции и далее в течение трех суток (одно введение в день). Выбор доз исследуемого соединения и референтного препарата был основан на ранее проведенных исследованиях [7]. На 4-й день с момента воспроизведения ишемии крыс под хлоралгидратной анестезией (350 мг/кг, интраперитонеально) декапитировали и извлекали головной мозг. Далее мозг гомогенизировали в среде, содержащей 1 ммоль ЭДТА, 215 ммоль маннита, 75 ммоль сахарозы, 0,1%-ный раствор БСА, 20 ммоль НЕРЕС, с рН 7,2. Полученный гомогенат центрифугировали на холоду при 1400 г 5 мин, после чего супернатант повторно центрифугировали при 13000 г 15 мин. Полученный вторичный супернатант удаляли для проведения респирометрического анализа. Активность комплексов митохондриальной дыхательной цепи определяли методом респирометрии с использованием системы лабораторного респирометра АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, РФ) при внесении в анализируемую среду разобщителей (ротенон – 1 мкМ; натрия азид – 20 ммоль; олигомицин – 1 мкг/мл) и субстратов (пировиноградная кислота – 10 ммоль; малат – 1 ммоль; сукцинат – 10 ммоль; аскорбат – 2 ммоль; АДФ – 1 ммоль; N,N,N',N'-тетраметил-1,4-фенилендиамин (TMPD) – 0,5 ммоль) митохондриального дыхания. Активность дыхательных комплексов оценивали по изменению потребления кислорода в пересчете на концентрацию белка в анализируемом образце:

комплекс I – по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси малат/пируват и ротенона;

комплекс II – по разнице потребления кислорода после внесения в среду сукцината и олигомицина;

комплекса IV – по разнице потребления кислорода после внесения в среду смеси ротенон/TMPD/аскорбат и азида натрия;

комплекса V – по разнице потребления кислорода после внесения в среду ротенона и АДФ [9].

Содержание общего белка определяли по методу Бредфорда [10].

Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с применением про-

граммного пакета STATISTICA 6.0. Данные выражали в виде  $M \pm SEM$ . Сравнение средних осуществляли методом ANOVA с постобработкой Ньюмена–Кейсла при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данного исследования установлено, что у животных группы НК в сравнении с ложнооперированными крысами наблюдалось уменьшение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи (рисунок): активность комплекса I снизилась в 2 раза ( $p < 0,05$ ); комплекса II – в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ); комплекса IV – в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ) и комплекса V – в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ).

Полученные данные группы НК могут свидетельствовать о том, что в условиях ишемического поражения головного мозга отмечается развитие митохондриальной дисфункции, что в свою очередь согласуется с ранее проведенными исследованиями.

Введение животным янтарной кислоты в дозе 100 мг/кг способствовало увеличению активности дыхательных комплексов. При этом у крыс, получавших янтарную кислоту, относительно группы животных, лишенных фармакологической поддержки, наблюдалось повышение активности комплекса I – на 24% ( $p < 0,05$ ); комплекса II – на 22% ( $p < 0,05$ ); комплекса IV – на 69% ( $p < 0,05$ ) и комплекса V – на 57% ( $p < 0,05$ ).

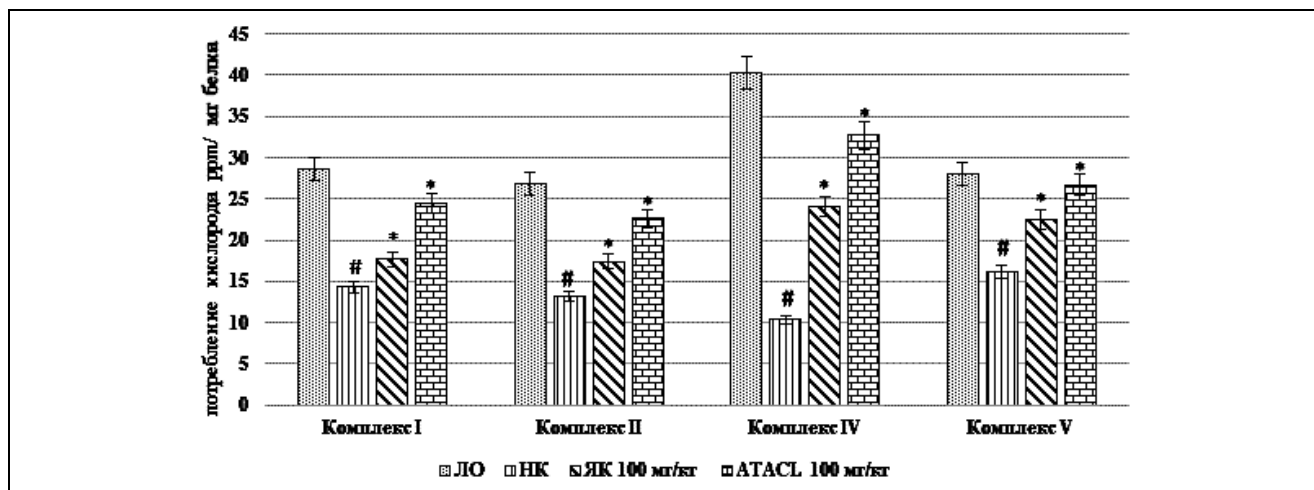
На фоне применения соединения АТАСЛ также отмечено восстановление митохондриальной функции, выражаемое в повышении каталитических свойств дыхательных комплексов. Так, при введении крысам исследуемого соединения

АТАСЛ активность комплекса I превосходила аналогичный показатель НК группы животных на 71% ( $p < 0,05$ ), активность комплекса II увеличилась на 86% ( $p < 0,05$ ). При этом стоит отметить, что на фоне введения соединения АТАСЛ наблюдалась нормализация функции электроногенных митохондриальных комплексов IV и V, активность которых была в 2,29 раза ( $p < 0,05$ ) и 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) выше таковой у крыс, лишенных фармакологической поддержки. У животных, которым вводили соединение АТАСЛ, активность митохондриальных комплексов I, II, IV и V увеличилась по отношению к крысам, получавшим янтарную кислоту на 38,4% ( $p < 0,05$ ), 52,9% ( $p < 0,05$ ), 35,7% ( $p < 0,05$ ) и 18,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Структурные и функциональные нарушения митохондрий играют существенную роль в патогенезе ишемически-гипоксического повреждения органов и тканей, в особенности тех структур, которые в значительной степени чувствительны к недостатку кислорода и макроэргических соединений, например, тканей головного мозга [11].

Известно, что митохондриальная дисфункция является неотъемлемой составляющей «ишемического каскада» церебрального повреждения и во многом ассоциирована с недостатком АТФ, развивающегося в ходе нарушения реакций переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий [12].

При этом разобщение реакций электронного транспорта, наблюдаемое в условиях ишемии, отмечается чаще всего на уровне комплексов I и IV, которые становятся главными источниками активных форм кислорода в клетке, усугубляя тем са-



Влияние соединения АТАСЛ и янтарной кислоты на изменение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи у крыс в условиях церебральной ишемии (ЛО – ложнооперированные животные; НК – группа крыс негативного контроля; ЯК – группа животных, получавшая янтарную кислоту; АТАСЛ – группа крыс, получавшая соединение АТАСЛ; # – статистически достоверно по отношению к группе ЛО; \* – статистически достоверно относительно группы НК)



мым течение ишемического процесса. В связи с этим можно предположить, что восстановление функциональных свойств дыхательных комплексов будет способствовать снижению степени митохондриального повреждения [13]. Установлено, что применение янтарной кислоты и 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты в условиях ишемии головного мозга способствовало повышению активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи. При этом нормализация функции дыхательных комплексов может быть связана с биохимическим шунтированием НАДН-дегидрогеназы и включением восстановительных эквивалентов в митохондриальную дыхательную цепь в обход комплекса I [14]. В результате чего может наблюдаться нормализация реакций электронного транспорта от сукцинатдегидрогеназы к  $F_1F_0$  АТФ-синтазе и уменьшению продукции активных форм кислорода, что в свою очередь повышает активность комплекса I [15].

## ВЫВОДЫ

В условиях экспериментальной фокальной ишемии головного мозга у крыс отмечается снижение активности комплексов митохондриальной дыхательной цепи, что свидетельствует о развитии митохондриальной дисфункции. Применение янтарной кислоты и 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты в дозе 100 мг/кг *per os* способствует восстановлению активности комплексов I, II, IV и V дыхательной цепи. При этом по величине фармакологического эффекта 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричная кислота превосходит референтный препарат – янтарную кислоту.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*. 2019; 16(1):142.
2. Ma Y., Liu Y., Zhang Z., Yang G.Y. Significance of Complement System in Ischemic Stroke: A Comprehensive Review. *Aging Dis.* 2019; 10(2):429–462.
3. Mondal N.K., Behera J., Kelly K.E., George A.K., Tyagi P.K., Tyagi N. Tetrahydrocurcumin epigenetically mitigates mitochondrial dysfunction in brain vasculature during ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2019; 122:120–138.
4. Ham P.B. 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol.* 2017; 157:92–116.
5. Nguyen H., Zarriello S., Rajani M., Tuazon J., Napoli E., Borlongan C.V. Understanding the Role of Dysfunctional and Healthy Mitochondria in Stroke Pathology and Its Treatment. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7):2127.
6. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F<sub>1</sub>ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2015; 95(4):1111–1155.
7. Воронков А.В., Абаев В.Т., Оганесян Э.Т., Поздняков Д.И. Некоторые аспекты церебропротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты при ишемическом повреждении головного мозга в эксперименте. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2018; 13(1-1): 90–93.
8. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981; 1(1): 53–60.
9. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А., Хури Е.И., Мирошниченко К.А., Сосновская А.В., Олохова Е.А. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза. *Фармация и фармакология.* 2019; 7(1): 20–31.
10. He F. Bradford Protein Assay. *Bio-101.* 2011; e45. DOI: 10.21769/BioProtoc.45.
11. Klacanova K., Kovalska M., Chomova M., et al. Global brain ischemia in rats is associated with mitochondrial release and downregulation of Mfn2 in the cerebral cortex, but not the hippocampus. *Int. J. Mol. Med.* 2019; 43(6): 2420–2428.
12. Kumar R., Bukowski M.J., Wider J.M., et al. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016; 76: 68–75.
13. Kuznetsov A.V., Javadov S., Margreiter R., Grimm M., Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J. The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants.* 2019; 8(10): 454.
14. Deroche-Gamonet V., Revest J.M., Fiancette J.F., Balado E., Koehl M., Grosjean N., et al. Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine-seeking behavior. *Molecular psychiatry.* 2019; 24(2): 312–320.
15. Oyedotun K.S., Lemire B.D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(10): 9424–9431.

Поступила 2 марта 2020 г.

# INFLUENCE OF A CINNAMIC ACID DERIVATIVE ON CHANGES IN THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEXES IN EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA

© Authors, 2020

**D.I. Pozdnyakov**

Ph.D. (Pharm.), Head of Living System Laboratory, Associate Professor,  
Department of Pharmacology with Clinical Pharmacology Course, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

**D.S. Zolotyh**

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,  
Analytical Chemistry Department, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute  
E-mail: metranidazol@mail.ru

**M.V. Larskij**

Ph.D. (Pharm.), Head of Pharmaceutical Chemistry Department,  
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute  
E-mail: pharmacchemistry@mail.ru

**Relevance.** It is known that mitochondrial dysfunction is a significant pathogenetic mechanism of ischemic brain damage and a promising pharmacotherapeutic target for cerebroprotective therapy.

**The aim** of the study. To evaluate the effect of 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid on the change of the mitochondrial respiratory chain complexes activity in rats brain supernatant in cerebral ischemia conditions.

**Material and methods.** The study was performed on male Wistar rats that reproduced cerebral ischemia using the Tamura method. 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid was administered at a dose of 100 mg / kg (per os) after 30 minutes when ischemia was reproduced and then once a day for 3 days. On day 4, a change in the activity of mitochondrial complexes I, II, IV, and V in the supernatant of the brain was assessed by the respirometric method.

**Results.** Against the background of the administration of 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid into animals, an increase in the activity of mitochondrial complexes was noted: NADH-dehydrogenase; succinate dehydrogenase; cytochrome c - oxidase; F1F0 ATP synthase in relation to animals that did not receive pharmacological support by 71% ( $p < 0.05$ ); 86% ( $p < 0.05$ ); 2.29 times ( $p < 0.05$ ) and 1.9 times ( $p < 0.05$ ) times, respectively. It should be noted that the 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid test compound exceeded the reference drug succinic acid in an equivalent dose in terms of therapeutic efficacy.

**Conclusions.** Based on the obtained results it can be assumed that 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid has a cerebroprotective effect due to the restoration of mitochondrial function and the elimination of energy deficiency arising in the area of ischemic penumbra.

**Key words:** cerebral ischemia, mitochondrial dysfunction, cinnamic acid derivatives.

**For citation:** Pozdnyakov D.I., Zolotyh D.S., Larskij M.V. Influence of a cinnamic acid derivative on changes in the activity of mitochondrial respiratory chain complexes in experimental brain ischemia. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(6):50–54. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-06-09>

**REFERENCES**

- Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation*. 2019; 16(1):142.
- Ma Y., Liu Y., Zhang Z., Yang G.Y. Significance of Complement System in Ischemic Stroke: A Comprehensive Review. *Aging Dis.* 2019; 10(2):429–462.
- Mondal N.K., Behera J., Kelly K.E., George A.K., Tyagi P.K., Tyagi N. Tetrahydrocurcumin epigenetically mitigates mitochondrial dysfunction in brain vasculature during ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2019; 122:120–138.
- Ham P.B. 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol.* 2017; 157:92–116.
- Nguyen H., Zarriello S., Rajani M., Tuazon J., Napoli E., Borlongan C.V. Understanding the Role of Dysfunctional and Healthy Mitochondria in Stroke Pathology and Its Treatment. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7):2127.
- Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2015; 95(4):1111–1155.
- Voronkov A.V., Abaev V.T., Oganessian E.T., Pozdnyakov D.I. Nekotorye aspekty tserebroprotektornoy aktivnosti 4-gidroksi-3,5-di-trebutil korichnoj kisloty pri ishemicheskom povrezhdenii golovnogo mozga v eksperimente. *Meditinskij vestnik Severnogo Kavkaza.* 2018; 13(1-1): 90–93.
- Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1981; 1(1): 53–60.
- Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Nigaryan S.A., Khuri E.I., Miroshnichenko K.A., Sosnovskaya A.V., Olokhova E.A. Otsenka respirometricheskoj funktsii mitokhondrij v usloviyakh patologij razlichnogo geneza. *Farmatsiya i farmakologiya.* 2019; 7(1): 20–31.
- He F. Bradford Protein Assay. *Bio-101.* 2011: e45. DOI: 10.21769/BioProtoc.45.
- Klaczanova K., Kovalska M., Chomova M., et al. Global brain ischemia in rats is associated with mitochondrial release and downregulation of Mfn2 in the cerebral cortex, but not the hippocampus. *Int. J. Mol. Med.* 2019; 43(6): 2420–2428.
- Kumar R., Bukowski M.J., Wider J.M., et al. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016; 76: 68–75.
- Kuznetsov A.V., Javadov S., Margreiter R., Grimm M., Hagenbuchner J., Ausserlechner M.J. The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants.* 2019; 8(10): 454.
- Deroche-Gamonet V., Revest J.M., Fiancette J.F., Balado E., Koehl M., Grosjean N., et al. Depleting adult dentate gyrus neurogenesis increases cocaine-seeking behavior. *Molecular psychiatry.* 2019; 24(2): 312–320.
- Oyedotun K.S., Lemire B.D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(10): 9424–9431.