

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГИПЕРОЗИДА В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА IV

Д.И. Поздняков

к.фарм.н., доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск, Россия)
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Актуальность. Нейропротекция является одной из значимых составляющих терапии заболеваний центральной нервной системы, сопряженных с нарушением энергетического метаболизма. Непосредственной причиной дефицита внутриклеточного пула макроэргических соединений может являться дисфункция митохондриального комплекса IV. Гиперозид – соединение флавоноидного ряда, обладающее обширным спектром фармакологической активности, в том числе потенциально высокими нейропротективными свойствами.

Материал и методы. Дефицит активности митохондриального комплекса IV моделировали у крыс Wistar путем интрацеребрального введения 3 М раствора натрия азида – ингибитора митохондриального комплекса IV. Гиперозид и референс-препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат вводили перорально в дозе 100 мг/кг на протяжении 30 дней с момента инъекции натрия азида. После этого у животных в ткани головного мозга оценивали интенсивность пируват-зависимого клеточного дыхания и изменение концентрации митохондриального пероксида водорода.

Результаты. Установлено, что курсовое введение гиперозида и препарата сравнения способствовало повышению интенсивности клеточного дыхания, что выражалось в увеличении АТФ-генерирующей активности, максимального уровня дыхания и респирометрической емкости по отношению к нелеченым животным. Также применение референс-препарата и гиперозида способствовало статистически значимому ($p < 0,05$) снижению содержания митохондриального пероксида водорода, при этом более выраженные изменения были получены при введении животным гиперозида.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что курсовое введение гиперозида в условиях энергетического дефицита, вызванного дефицитом митохондриального комплекса IV, повышает интенсивность процессов клеточного дыхания и препятствует генерации активных форм кислорода, что в свою очередь может являться свидетельством наличия нейропротекторного действия.

Ключевые слова: нейротекторное действие, флавоноиды, гиперозид, митохондриальный комплекс IV.

Для цитирования: Поздняков Д.И. Нейропротекторные эффекты гиперозида в условиях дефицита активности митохондриального комплекса IV. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(8):48–52. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-08-06>

Гиперозид – основной флавоноид представителей родов *Hypericum* и *Crataegus*. Спектр фармакологической активности гиперозида крайне широк и включает в себя антидепрессивные, антиоксидантные, противовоспалительные и эндотелиопротекторные свойства [1]. Недавние исследования позволяют предполагать наличие у гиперозида нейропротекторного действия. Так, Fan H., et al. (2021) показали, что гиперозид препятствует нейродегенерации культуры нейронов при их обработке ротеноном. Как известно, ротенон является цитотоксичным соединением, основное действие которого связано с ингибированием комплекса I митохондриальной дыхательной цепи, что воспроизводит нейродегенеративный фенотип болезни Паркинсона [2]. Важным фактом, который был установлен Fan H., et al., является воздействие гиперозида на процессы аутофагии и апоптоза, что

может предполагать присутствие у данного соединения выраженного нейропротекторного эффекта. В ранее проведенных исследованиях также была продемонстрирована способность гиперозида к восстановлению метаболических реакций в мозговой ткани при церебральной ишемии, которая выражалась в снижении концентрации молочной кислоты при повышении уровня пирувата [3]. Таким образом, можно предполагать, что в условиях нейронального повреждения различной этиологии гиперозид проявит свойства эффективного нейропротектора, применение которого будет способствовать снижению интенсивности нейродегенеративного процесса. Помимо типичных заболеваний, связанных с потерей структурно-функциональной активности нейронов (например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона или травматической энцефалопатии), нейропротекторы могут ока-

заться эффективными средствами терапии ряда состояний, возникающих при недостатке кислорода и энергетическом дефиците мозговой ткани [4]. Одним из таких патогенетических вариантов повреждения головного мозга, возможно, является дефицит активности митохондриального комплекса IV, который воспроизводит ишемически-гипоксический фенотип патологического процесса [5]. В экспериментальных условиях нарушение функции митохондриального комплекса IV может быть смоделировано путем интрацеребральной инъекции ряда химических соединений-нейротоксикантов, представителем которых является натрия азид [6].

Цель исследования – оценить возможные нейропротекторные эффекты гиперозид в условиях дефицита активности митохондриального комплекса IV *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 40 крысах-самцах Wistar, содержащихся на время исследования в стандартных условиях вивария (температура воздуха 18–22 °С, влажность воздуха 55–65%, двенадцатичасовой суточный цикл) со свободным доступом к корму и воде. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово». Дизайн исследования, размещение животных и манипуляции, проводимые с ними, соответствовали международным нормам экспериментальной этики, изложенным в Директиве ЕС2010/63 «О защите животных, используемых в научных целях». Дефицит активности митохондриального комплекса IV моделировали путем введения в ткань головного мозга 3 М раствора натрия азида. Крыс анестезировали хлоралгидратом (350 мг/кг, внутривенно). В теменной кости проделывали трепанационное отверстие диаметром 1 мм, после чего поочередно в левое и правое полушарие мозга микродозатором вводили раствор натрия азида в конечном объеме 0,5 мкл. Было выполнено четыре инъекции (две в правое полушарие, две в левое полушарие). Костную ткань восстанавливали, используя пломбирочную пасту «Дентин-паста» [7]. Выбор экспериментальной модели дефицита активности митохондриального комплекса IV основывался на способности натрия азида прямо ингибировать активность комплекса, что отражено в работе [8].

Рану ушивали, крыс оставляли под согревающей лампой до пробуждения. В ходе выполнения исследования были сформированы следующие экспериментальные группы: ЛО – ложнопериован-

ные животные; НК – негативный контроль; группа животных, которым вводили референс-препарат – этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол», Фармасофт, Россия); группа крыс, получавшая гиперозид (Hunan Warrant Pharmaceuticals, КНР, чистота 98%). Число особей в каждой экспериментальной группе равнялось десяти. Препарат сравнения и гиперозид вводили *per os*, в эквивалентных дозах, равных 100 мг/кг [3] в течение 30 дней с момента введения натрия азида. Выбор референс-препарата основан на данных ранее проведенных исследований, в которых было установлено, что применение этилметилгидроксипиридина сукцината способствовало восстановлению активности митохондриального комплекса IV в условиях ишемического повреждения головного мозга [9].

На 31-й день эксперимента крыс декапитировали под анестезией и извлекали головной мозг, который использовали в качестве анализируемого биоматериала. Головной мозг гомогенизировали в среде, состоящей из 1 ммоль/л ЭГТА, 215 ммоль/л маннита, 75 ммоль/л сахарозы, 20 ммоль/л HEPES и 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина; pH среды составлял 7,2. Полученный гомогенат центрифугировали при ускорении 1100 g 2 мин. Супернатант переносили в пробирки эппендорф и наслаивали 10%-раствор перколла. Полученную смесь повторно центрифугировали при ускорении 18000 g в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующей среды и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g [10]. Вторичный супернатант использовали для проведения респирометрического анализа и оценки изменения митохондриального пероксида водорода (MitoH₂O₂).

Респирометрический анализ выполняли на системе лабораторного респирометра АКПМ 1-01 Л (Alpha Bassens, Россия). Интенсивность клеточного дыхания определяли по изменению потребления кислорода в среде на фоне введения разобщителей клеточного дыхания: олигомицин – 1 мкг/мл; 4-(трифторметокси) фенил гидразоно) малонитрил (FCCP) – 1 мкг/мл; ротенон – 1 мкг/мл. По разнице потребления кислорода определяли АТФ-генерирующую способность (после добавления FCCP и олигомицина); максимальный уровень дыхания (после добавления FCCP и ротенона) и респирометрическая емкость (разница в потреблении кислорода после добавления FCCP и базальным уровнем потребления кислорода). В качестве субстрата для дыхания использовали пируват 15 ммоль/л. По-

требление кислорода в образцах выражали в пересчете на содержание белка, которое оценивали по методу Бредфорда. Концентрацию MitoH₂O₂ измеряли по изменению флуоресцентного сигнала окрашенного резорурфина при длине волны возбуждения/эмиссии 570/585 нм [11].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с применением программного пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Данные выражали в виде M±SEM (среднее ± стандартная ошибка среднего). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка, однородность дисперсии – с применением критерия Левена. Статистическую зна-

чимость различий между группами проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-обработкой Ньюмена–Кейсла при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя изменение показателей, полученных при изучении процессов клеточной респирометрии (рис. 1) у животных группы НК, установили снижение АТФ-генерирующей способности – на 63,4% ($p < 0,05$); максимального уровня дыхания – на 60,7% ($p < 0,05$) и респирометрической емкости – на 75,5% ($p < 0,05$) относительно показателей ЛО крыс.

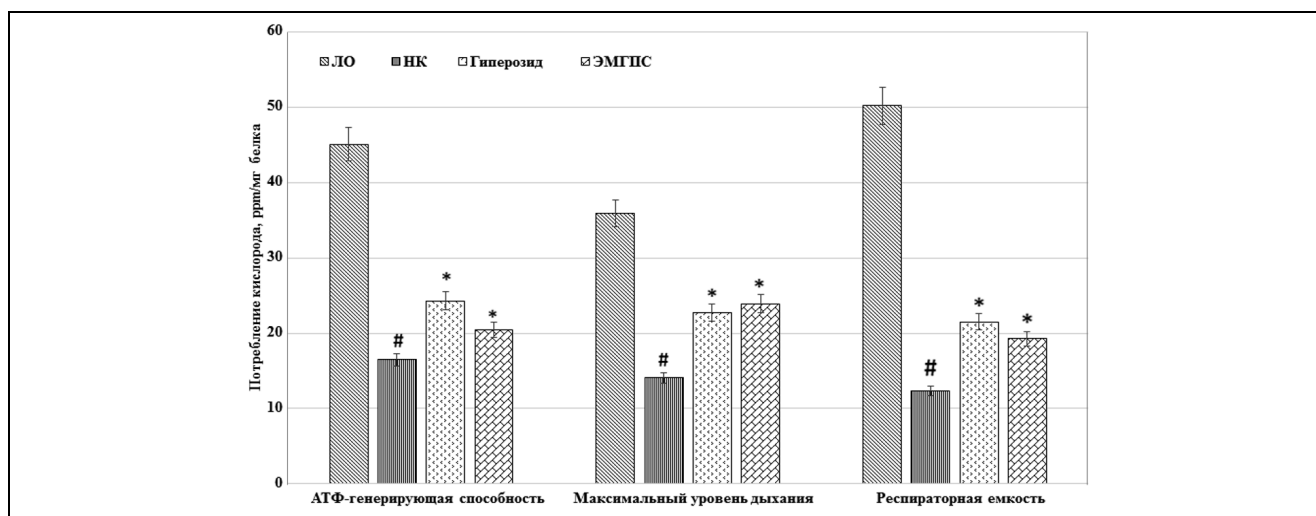


Рис. 1. Влияние гиперозида и этилметилгидроксипиридина сукцината на изменение респирометрической функции митохондрий в условиях NaN₃-индуцированной цитотоксичности (# – статистически значимо относительно ЛО животных ($p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса); * – статистически значимо относительно животных группы НК ($p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса))

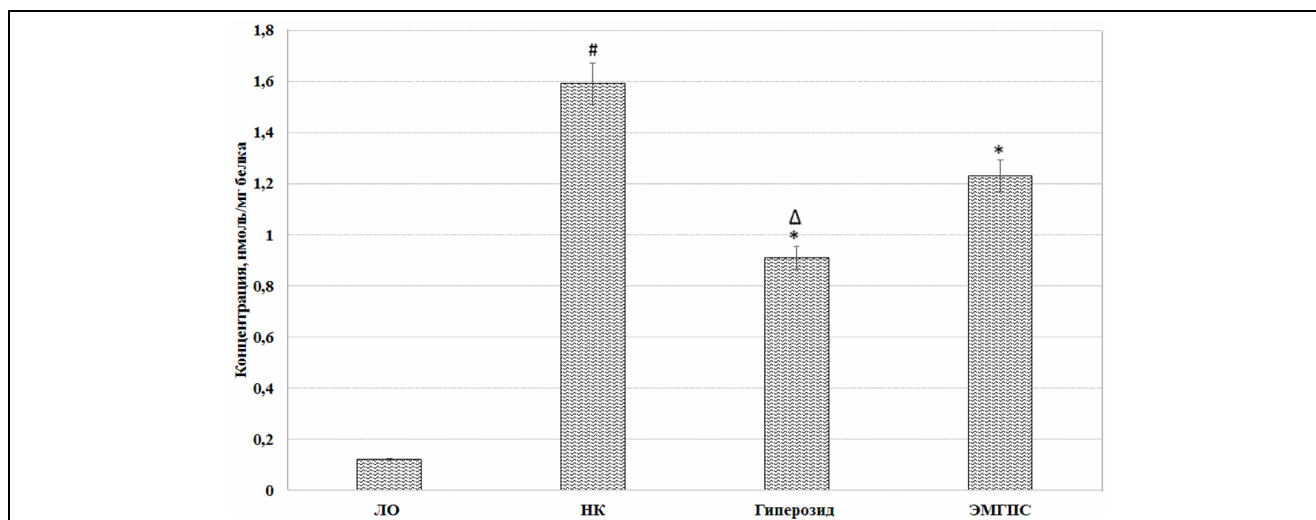


Рис. 2. Влияние гиперозида и этилметилгидроксипиридина сукцината на изменение концентрации митохондриального пероксида водорода в мозговой ткани в условиях NaN₃-индуцированной цитотоксичности (# – статистически значимо относительно ЛО животных ($p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса); * – статистически значимо относительно животных группы НК ($p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса); Δ – статистически значимо относительно животных, получавших ЭМГПС ($p < 0,05$, критерий Ньюмена–Кейлса))

Следует отметить, что у животных, лишенных фармакологической поддержки, в митохондриальной фракции головного мозга наблюдалось увеличение концентрации митохондриального пероксида водорода (рис. 2), содержание которого превосходило аналогичный показатель ЛО крыс в 13,3 раза ($p < 0,05$).

Изменение процессов клеточного дыхания и генерации активных форм кислорода, полученные у крыс группы НК, в совокупности отражают негативное влияние натрия азида на биоэнергетические процессы и в целом на функциональную активность митохондрий клетки.

Известно, что натрия азид является одним из сильнейших митохондриальных токсинов, прямо инактивирующий такие важные дыхательные ферменты, как цитохром-с-оксидаза, что, в свою очередь, нарушает процессы переноса электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий и снижает их энергосинтетическую функцию.

Другим негативным эффектом, вносящим весомый вклад в митохондриальную токсичность натрия азида, является способность данного соединения повышать образование немитохондриальных активных форм кислорода, что приводит к выраженному повреждению нервной ткани [8].

В то же время курсовое введение животным референс-препарата и гиперозида существенно уменьшало митохондриальную токсичность натрия азида. Так, у крыс, которым вводили ЭМГПС, по сравнению с группой животных НК отмечено повышение АТФ-генерирующей активности, максимального уровня дыхания и респираторной емкости на 23,6; 69,5 и 56,9% (все показатели $p < 0,05$) при снижении концентрации MitoH_2O_2 на 22,6% ($p < 0,05$). На фоне введения животным гиперозида АТФ-генерирующая активность, максимальный уровень дыхания и респираторная емкость (рис. 1) были выше аналогичных показателей крыс группы НК на 47,3% ($p < 0,05$); 61,0% ($p < 0,05$) и 74,8% ($p < 0,05$) соответственно. При этом у животных, получавших гиперозид, содержание MitoH_2O_2 оказалось на 42,8% ($p < 0,05$) меньше такового у крыс группы НК и на 26,0% ($p < 0,05$) – относительно животных, которым вводили референс-препарат (рис. 2).

Полученные данные демонстрируют, что при пероральном введении гиперозид в дозе 100 мг/кг смягчает эффекты блокады митохондриального комплекса IV, что отражается на процессах генерации активных форм кислорода (митохондриаль-

ный пероксид водорода), а именно отмечается снижение их содержания. Также стоит отметить, что введение гиперозида способствовало повышению энергосинтетической функции митохондрий клетки.

В совокупности полученные результаты отражают высокий нейропротекторный потенциал гиперозида как метаболического средства с антиоксидантным эффектом. При этом основой для реализации фармакологического эффекта гиперозида может являться восстановление митохондриальной функции. Так, согласно последним литературным данным, митохондриальная нейропротекция может являться перспективным направлением адьювантной терапии ряда заболеваний центральной нервной системы, в частности тех, которые носят нейродегенеративный или ишемический характер. Kaushik et al. (2021) продемонстрировали, что стабилизация митохондриальной функции положительно отражается на активности нейронов при ишемическом инсульте [12]. Abyadeh et al. (2021) показали терапевтические преимущества улучшения митохондриальной функции при болезни Альцгеймера [13].

Таким образом, восстановление активности митохондриального комплекса IV в условиях изолированного дефицита его активности может лежать в основе более глубоких структурно-функциональных изменений митохондрий клетки, что положительно отражается на их физиологических свойствах. Данная особенность действия гиперозида открывает определенные перспективы его использования в качестве нейропротекторного средства не только при специфических митохондриальных поражениях, но и при нейродегенеративных или ишемических заболеваниях головного мозга.

ВЫВОДЫ

Исследование показало, что интрацеребральная инъекция натрия азида сопровождается снижением энергосинтетической функции митохондрий и активацией окислительного стресса. Курсовое применение гиперозида и референс-препарата – этилметилгидроксипиридина сукцината позволило значительно снизить нейротоксический эффект натрия азида, что выразилось в повышении АТФ-генерирующей функции митохондрий, стабилизации аэробного обмена (повышение максимального уровня дыхания и респираторной емкости) и элиминации окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhou J., Zhang S., Sun X., Lou Y., Yu J. Hyperoside Protects HK-2 Cells Against High Glucose-Induced Apoptosis and Inflammation via the miR-499a-5p/NRIP1 Pathway. *Pathol Oncol Res.* 2021; 27: 629829.
2. Fan H., Li Y., Sun M., Xiao W., Song L., Wang Q., Zhang B., Yu J., Jin X., Ma C., Chai Z. Hyperoside Reduces Rotenone-induced Neuronal Injury by Suppressing Autophagy. *Neurochem Res.* 2021; 46(12): 3149–3158.
3. Воронков А.В., Нугарян С.А., Поздняков Д.И. Церебропротекторная активность мальвидина, гиперозида и глицитеина в условиях фокальной ишемии головного мозга. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020; 83(7): 3–6. (Voronkov A.V., Nigaryan S.A., Pozdnyakov D.I. Cerebroprotectornaya aktivnost' mal'vidina, giperozida i gliciteina v usloviyah fokal'noj ishemii golovnogo mozga. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2020; 83(7): 3–6.)
4. Gil A., Martín-Montañez E., Valverde N., Lara E., Boraldi F., Claros S., Romero-Zerbo S.Y., Fernández O., Pavia J., Garcia-Fernandez M. Neuronal Metabolism and Neuroprotection: Neuroprotective Effect of Fingolimod on Menadione-Induced Mitochondrial Damage. *Cells.* 2020; 10(1): 34.
5. Greco P., Nencini G., Piva I., Scioscia M., Volta C.A., Spadaro S., Neri M., Bonaccorsi G., Greco F., Cocco I., Sorrentino F., D'Antonio F., Nappi L. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta Neurol Belg.* 2020; 120(2): 277–288.
6. Zuo Y., Hu J., Xu X., Gao X., Wang Y., Zhu S. Sodium azide induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells through Pgc-1 α -associated signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2019; 19(3): 2211–2219.
7. Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Adzhiakhmetova S.L., Chervonnaya N.M., Miroshnichenko K.A., Sosnovskaya A.V., Chershekova E.I. Effect of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) and marigold (*Tagetes Patula* L.) Extracts on hippocampal mitochondria functional activity within conditions of experimental acute brain hypometabolism. *Pharmacy & Pharmacology.* 2019; 7(4): 198–207.
8. Sia P.I., Wood J.P.M., Chidlow G., Casson R. Creatine is neuroprotective to retinal neurons *in vitro* but not *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019 Oct 1; 60(13): 4360–4377.
9. Pozdnyakov D.I., Zolotykh D.S., Larsky M.V. Correction of mitochondrial dysfunction by succinic acid derivatives under experimental cerebral ischemia conditions. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* 2021; 34(1): 42–48.
10. Olajide O.J., Enaibe B.U., Bankole O.O., Akinola O.B., Laoye B.J., Ogundele O.M. Kolaviron was protective against sodium azide (NaN₃) induced oxidative stress in the prefrontal cortex. *Metab Brain Dis.* 2016; 31(1): 25–35.
11. Connolly N.M.C., Theurey P., Adam-Vizi V. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 542–572.
12. Kaushik P., Ali M., Salman M., Tabassum H., Parvez S. Harnessing the mitochondrial integrity for neuroprotection: Therapeutic role of piperine against experimental ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2021; 149: 105138.
13. Abyadeh M., Gupta V., Chitranshi N., Gupta V., Wu Y., Saks D., Wander Wall R., Fitzhenry M.J., Basavarajappa D., You Y., Salekdeh G.H., Haynes P.A., Graham S.L., Mirzaei M. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease – a proteomics perspective. *Expert Rev Proteomics.* 2021; 18(4): 295–304.

Поступила после доработки 15 апреля 2022 г.

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF HYPEROSIDE, UNDER CONDITIONS OF MITOCHONDRIAL COMPLEX IV ACTIVITY DEFICIENCY

© D.I. Pozdnyakov, 2022

D.I. Pozdnyakov

Ph.D. (Pharm.), Head of the Laboratory of Living Systems, Associate Professor of the Department of Pharmacology with a Course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University (Pyatigorsk, Russia)
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Relevance. Neuroprotection is one of the significant components of the therapy of the central nervous system diseases which are associated with a violation of energy metabolism. The immediate cause of the deficiency of the intracellular pool of macroergic compounds may be the dysfunction of the mitochondrial complex IV. Hyperoside is a flavonoid with an extensive spectrum of pharmacological activity, including potentially high neuroprotective properties.

Material and methods. Mitochondrial complex IV activity deficiency was modeled in Wistar rats by intracerebral injection of 3M sodium azide solution, an inhibitor of mitochondrial complex IV. Hyperoside and the reference drug ethylmethylhydroxypyridine succinate were administered orally at a dose of 100 mg / kg, for 30 days from the moment of injection of sodium azide. After that, the intensity of pyruvate-dependent cellular respiration and changes in the concentration of mitochondrial hydrogen peroxide in the brain tissue of animals were evaluated.

Results. In the course of the work, it was found that the course administration of hyperoside and a reference drug contributed to an increase in the intensity of cellular respiration, which was expressed in an increase in ATP-generating activity, the maximum level of respiration and respirometric capacity in relation to untreated animals. Also, the use of the referent and hyperoside contributed to a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the content of mitochondrial hydrogen peroxide, while more pronounced changes were obtained when hyperoside was administered to animals.

Conclusion. The obtained results indicate that the course administration of hyperoside in conditions of energy deficiency caused by mitochondrial complex IV deficiency increases the intensity of cellular respiration processes and prevents the generation of reactive oxygen species, which in turn may be evidence of the presence of neuroprotective action.

Key words: neuroprotective effect, flavonoids, hyperoside, mitochondrial complex IV.

For citation: Pozdnyakov D.I. Neuroprotective effects of hyperoside, under conditions of mitochondrial complex IV activity deficiency. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2022;25(8):48–52. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-08-06>