

УДК 576.308(343)



## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ТЫКВЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*CUCURBITA PEPO L.*) И ЭКСТРАКТА БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ (*TAGETES PATULA L.*) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ГИПОМЕТАБОЛИЗМА ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная,  
К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Россия, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Получено 09.07.2019

Рецензия (1) 31.07.2019

Рецензия (2) 08.08.2019

Принята к печати 15.08.2019

**Цель исследования.** Оценить влияние экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo L.*) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula L.*) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 50 крысах-самцах линии *Wistar*, которым моделировали острое гипометаболическое состояние путем введения 3М раствора натрия азида в гиппокамп ( $n=40$  и  $n=10$  – группа ложнопериорированных животных). Исследуемые экстракты и препарат сравнения – EGb 761 вводили в дозе 100 мг/кг *per os*, профилактически на протяжении 10 дней. Через 24 часа после введения натрия азида осуществляли забор головного мозга, выделяли гиппокамп с получением супернатанта и определением в нем параметров митохондриального дыхания, интенсивности анаэробных процессов, концентрации апоптоз-индуцирующего фактора, эндонуклеазы G и  $\beta$ -амилоида.

**Результаты исследования.** В ходе исследования было установлено, что профилактическое введение изучаемых экстрактов тыквы и бархатцев способствовало восстановлению митохондриальной функции и снижению интенсивности анаэробных процессов. При этом в группах крыс, получавших экстракт тыквы и бархатцев, отмечено повышение концентрации АТФ в супернатанте гиппокампа относительно животных без фармакологической поддержки на 65,7% ( $p<0,002$ ) и 66,2% ( $p<0,002$ ); соответственно. Также при введении крысам экстрактов тыквы и бархатцев наблюдалось снижение концентрации апоптоз-индуцирующего фактора (на 33 % ( $p<0,002$ ) и 38,3% ( $p<0,002$ ) соответственно) и эндонуклеазы G (в 3,6 раза ( $p<0,002$ ) и в 4,4 раза ( $p<0,002$ ) соответственно). При применении исследуемых экстрактов тыквы и бархатцев отмечено снижение концентрации амилоидного  $\beta$ -пептида в гиппокампе крыс на 54,4% ( $p<0,0002$ ) и 54,4% ( $p<0,0002$ ) соответственно. При этом исследуемые экстракты обладали эквивалентной терапевтической эффективностью с препаратом сравнения.

**Заключение.** На основании полученных данных можно предположить перспективность дальнейшего изучения экстрактов тыквы и бархатцев как средств целенаправленной коррекции церебрального гипометаболизма.

**Ключевые слова:** растительные экстракты, гипометаболизм, гиппокамп, митохондрии

**Для цитирования:** А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова. Влияние экстракта тыквы обыкновенной (*cucurbita pepo l.*) и экстракта бархатцев распростертых (*tagetes patula l.*) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4): 198-207. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207

©А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова, 2019

**For citation:** A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya, K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.I. Chereschkova. 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. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207

## EFFECT OF PUMPKIN (*CUCURBITA PEPO L.*) AND MARIGOLD (*TAGETES PATULA L.*) EXTRACTS ON HIPPOCAMPAL MITOCHONDRIA FUNCTIONAL ACTIVITY WITHIN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ACUTE BRAIN HYPOMETABOLISM

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya,  
K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.I. Cheresheva

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University  
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 9 July 2019

Review (1) 31 July 2019

Review (2) 8 August 2019

Accepted: 15 August 2019

**The aim** of the study is to evaluate the effect of pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) and marigold extracts (*Tagetes patula L.*) on the hippocampal mitochondria functional activity within the conditions of experimental acute brain hypometabolism.

**Materials and methods.** The work was performed on 50 male Wistar rats, which reproduced an acute brain hypometabolic state by administration of a 3M sodium azide solution in hippocampus ( $n = 40$  and  $n = 10$  – a group of sham-operated animals). The test extracts and the reference drug – EGb 761 – were prophylactically administered at the dose of 100 mg/kg *per os* for 10 days. 24 hours after the last administration, sodium azide was injected, the brain was taken, the hippocampus was isolated to obtain a supernatant and determine the parameters of mitochondrial respiration, the intensity of anaerobic processes, the concentration of the apoptosis-inducing factor, endonuclease G, and  $\beta$ -amyloid.

**Results.** The carried out study established that the prophylactic administration of pumpkin and marigold extracts contributed to the restoration of a mitochondrial function and a decrease in the intensity of anaerobic processes. In the group of the rats treated with pumpkin and marigold extracts, an increase of ATP concentration in the hippocampal supernatant by 65.7% ( $p < 0.002$ ) was observed; it was 66.2% ( $p < 0.002$ ) relative to the animals deprived of pharmacological support. When the rats were treated with pumpkin and marigold extracts, a decrease in the concentration of apoptosis-inducing factor (by 33% ( $p < 0.002$ ) and 38.3% ( $p < 0.002$ ), respectively) and endonuclease G (by 3.6 times ( $p < 0.002$ ) and 4.4 times ( $p < 0.002$ ), respectively) was also noted. The administration of pumpkin and marigold extracts reduced the amyloid  $\beta$ -peptide concentration in the rats' hippocampus by 54.4% ( $p < 0.0002$ ) and 54.4% ( $p < 0.0002$ ), respectively. The test-extracts had an equivalent therapeutic efficacy with the reference drug.

**Conclusion** On the basis of the obtained data, it is possible to suggest the prospect of a further study of pumpkin and marigold extracts as the drugs of a targeted correction of cerebral hypometabolism.

**Keywords:** plant extracts, hypometabolism, hippocampus, mitochondria

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием на долю которого приходится 50–70% случаев деменции, что составляет более 12 млн. человек [1]. Как правило клинические проявления БА отмечаются на поздних этапах заболевания и ассоциируются с отложением в структурах головного мозга цитотоксического  $\beta$ -амилоида [2]. Амилоидный  $\beta$ -пептид образуется в результате протеолиза трансмембранного белка – белка предшественника амилоида (APP) при участии ферментов группы секретаз. На сегодняшний день установлено, что накопление  $\beta$ -амилоида является одним из наиболее достоверных и ранних признаков необратимой нейродегенерации [3]. В процессах деградации нейронов различные изоформы  $\beta$ -амилоида, которые образуют два типа цитотоксических конгломератов: агрегаты, не стабилизированные ионами металлов (как правило, растворимы в воде и имеют незначительный цитотоксический потенциал

и ассоциаты, в которых присутствуют двухвалентные ионы металлов (данные конгломераты образуют ковалентно сшитые олигомеры, которые затем откладываются в цитоплазме нейронов (преимущественно гиппокампа) в виде амилоидных бляшек) [4]. Избыток амилоидного  $\beta$ -пептида в клетках головного мозга приводит к необратимому фосфорилированию тау-протеина, в результате чего увеличивается продукция 4-гидроксиноненаля – мембранотоксичного альдегида, который в свою очередь инициирует окислительные процессы в нейрональных мембранах, сопровождающихся ухудшением функции ион-транспортных АТФаз, транспортеров глюкозы и глутамата [5]. В итоге описанные процессы приводят к ухудшению синаптической передачи и прогрессированию БА.

Исследователями *Del Prete D, et al., 2017* установлено, что белок предшественник амилоидного  $\beta$ -пептида может локализоваться на мембранах митохондрий, кроме того на митохондриальных мем-

бранах обнаруживается секретазный комплекс, преимущественно представленный  $\gamma$ -секретазой, что в свою очередь обеспечивает быстрый синтез  $\beta$ -амилоида из его предшественника [6]. При этом в ряде работ отмечается, что митохондриальный  $\beta$ -амилоид, может играть решающую роль в патологическом каскаде, приводящим к ранней гибели нейронов при БА. Так исследование *Lustbader J. W. et al., 2004*. показало, что имеется прямая связь между митохондриальной дисфункцией и гипометаболическим состоянием головного мозга с одной стороны и увеличением цитотоксичности  $\beta$ -амилоида с другой [7]. В дальнейшем *Chen X. et al. 2006* установили, что в условиях БА возникающий при увеличении концентрации амилоидного  $\beta$ -пептида гипометаболизм головного мозга связан со сбоем реакций электронного транспорта в митохондриальной дыхательной цепи, активацией анаэробных окислительных процессов и интенсификацией внутреннего пути апоптоза (эфektor – эндонуклеаза G) [8]. Однако, следует отметить, что активация митохондриального  $\gamma$ -секретазой комплекса отмечается только при снижении интенсивности метаболических реакций – гипометаболического состояния [9]. Таким образом, можно предположить, что целенаправленная фармакологическая коррекция церебрального гипометаболизма может являться перспективным методом раннего лечения БА. В связи с этим **ЦЕЛЬЮ** данного исследования являлась оценка влияния экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальные животные

В эксперименте использовались 50 крыс-самцов линии Wistar (половозрелые с массой тела 220–240 г.), полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (д. Рапполово, Ленинградская обл.). На время проведения исследования крысы содержались в стандартных условиях вивария при температуре воздуха  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , относительной влажности  $60 \pm 5\%$  и естественной смене суточного цикла. Животные размещались по 10 особей в макролоновых клетках, где в качестве подстилочного материала применяли гранулированную бумажную фракцию. Экструдированный корм и воду водопроводную крысы получали *ad libitum*. Содержание и манипуляции, проводимые с животными, соответствовали общепринятым этическим нормам экспериментальной работы (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.)).

## Исследуемые объекты

### Дизайн эксперимента

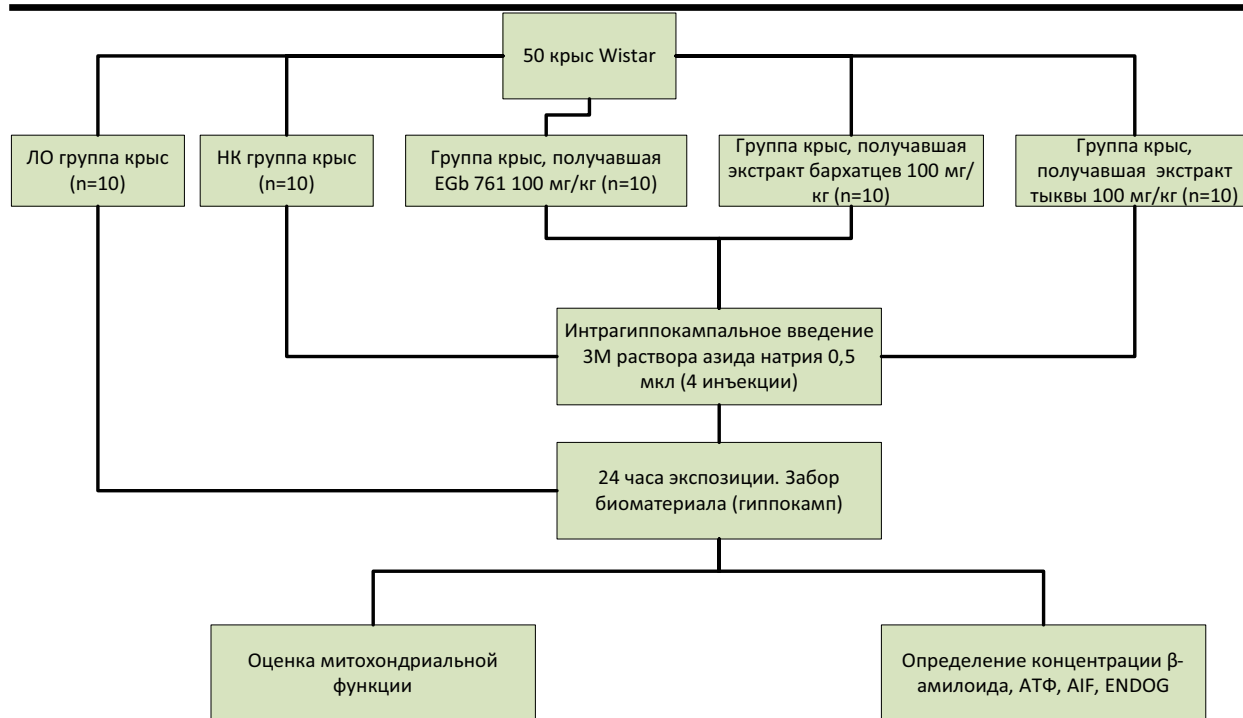
В качестве изучаемых объектов в данной работе выступали густой экстракт тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и густой экстракт бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.). Соцветия бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) сорта «Carmen» были собраны в ботаническом саду Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Плоды тыквы (*Cucurbita pepo* L.) сорта «Атлант среднепоздний» собраны на территории Ставропольского края Александровского района. Образцы сырья для исследования были заготовлены в период с июня по сентябрь 2016–2018 гг. В качестве сырья использовали свежие плоды тыквы и соцветия бархатцев, высушенные воздушно-теневым способом.

Препаратом сравнения служил EGb761 (стандартизованный экстракт гинкго билоба производства *Hunan Warrant Pharmaceuticals.*, КНР). Референтный препарат вводили *per os* в дозе 100 мг/кг [10] на протяжении 10 дней до оперативного вмешательства. Исследуемые объекты вводили аналогично препарату сравнения (профилактически, 10 дней в дозе 100 мг/кг). В ходе эксперимента были сформированы следующие экспериментальные группы животных: ложнооперированные крысы (ЛО, n=10); группа крыс негативного контроля, лишенная фармакологической поддержки (НК, n=10); группы животных, получавшие препарат сравнения и исследуемые соединения (n=10 каждая экспериментальная группа). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

## Экспериментальная модель

### гипометаболизма головного мозга

Церебральный гипометаболизм моделировали путем интрагиппокампального введения 3М раствора натрия азида, для чего животных наркотизировали (хлоралгидрат 350 мг/кг интраперитонеально), голову крыс фиксировали, удаляли шерстяной покров и скальпировали черепную коробку. Далее в левом и правом полушариях бором проделывали отверстия диаметром 1 мм со стереотаксическими координатами P:  $-3.0$ ; ML:  $\pm 3.0$ , V:  $-3.0$  (от Bregma), что соответствовало дорсальной части гиппокампа [11]. Затем иглу 30G медленно вводили в трепанационное отверстие на глубину 1,5 мм и осуществляли введение 3М раствора натрия азида (pH=7,4) в объеме 0,5 мкл, чередуя правое и левое полушария (всего было произведено 4 инъекции). Иглу вынимали по истечении 30 сек. с момента введения. Рану ушивали, шов обрабатывали 5% раствором йода. Забор биоматериала осуществляли через 24 часа после операции [12].



**Рисунок 1 – Дизайн эксперимента.**

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа животных негативного контроля; АТФ – аденозинтрифосфат; АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор; ENDOG – эндонуклеаза G.

### Забор и подготовка биоматериала

В качестве биоматериала в работе использовали гиппокамп крыс. Извлечение гиппокампа проводили согласно стандартной процедуре. Далее гиппокамп делили на 2 части: первую гомогенизировали в среде: 1ммоль ЭДТА+ 215 ммоль маннита+ 75 ммоль сахарозы+ 0,1% раствор БСА (бычий сывороточный альбумин)+ 20 ммоль НЕРЕС (рН 7,2), с последующим двукратным центрифугированием в режимах: 1,400 g → 3 мин. при 4°C (удаляется супернатант) и 13000g → 10 мин. Полученный вторичный супернатант удаляли для проведения респирометрического анализа. Вторую часть гиппокампа гомогенизировали в PBS с рН 7,4 в соотношении 1:7 и центрифугировали в режиме 10000g → 5 мин, затем образовавшийся супернатант брали на ИФА-исследование.

### Респирометрический анализ

В работе использовался ранее описанный подход к оценке респирометрической функций митохондрий. Исследование выполнено по протоколу SEAHORSE на лабораторном респирометре АКПМ-01Л (Альфа-Бассенс, РФ). В ходе анализа оценивали изменение потребления кислорода в среде, содержащей нативные митохондрии, на фоне введения разобщителей митохондриального дыхания: олигомицин 1 мкг/мл; 4 – (трифлуорометокси)фенилгидразоно)малонитрил (FCCP – 1 мМ); ротенон – 1 мМ; натрия азид – 20 ммоль. Субстратом окисления

при изучении интенсивности анаэробных процессов служила глюкоза (15 ммоль). При этом рассчитывали следующие показатели, характеризующие дыхательную функцию митохондрий: АТФ-генерирующую способность; максимальный уровень дыхания, респираторную емкость. Также определяли интенсивность гликолиза, гликолитическую емкость и гликолитический резерв [13].

### ИФА-исследование

В работе использовали стандартные наборы ИФА реактивов производства компании *Cloud clone* (США). При проведении исследования оценивали изменение следующих параметров: концентрация β-амилоида, апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ), эндонуклеазы G (ENDOG) и АТФ. Ход анализа соответствовал рекомендациям производителя (инструкция с протоколом анализа прилагалась к каждому набору). Считывание результатов осуществляли на микропланшетном ИФА-ридере *Infinite F50* (Tecan, Австрия).

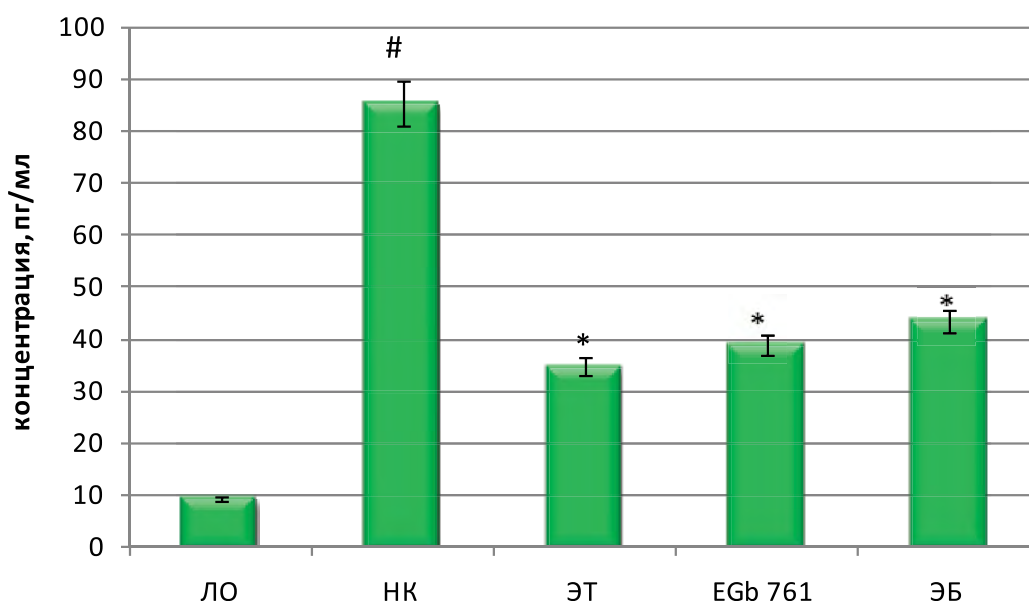
### Методы статистического анализа

Статистическую обработку полученных результатов производили в прикладном программном пакете STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Данные выражали в виде  $M \pm SEM$ . Сравнение групп средних осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Ньюмена-Кейсла.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ****Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации  $\beta$ -амилоида в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга**

В ходе данного блока работы было установлено, что концентрация  $\beta$ -амилоида (рис. 2) у ЛО группы крыс составляла  $9,46 \pm 0,09$  пг/мл. В то же время у НК группы животных в условиях экспериментального церебрального гипометаболизма

отмечено повышение концентрации амилоидного  $\beta$ -пептида в сравнении с ЛО группой животных в 9 раз ( $p < 0,0001$ ). Применение EGb761 способствовало снижению содержания цитотоксичного  $\beta$ -амилоида в гиппокампе крыс по отношению к НК группе животных на 54,4% ( $p < 0,0002$ ). На фоне введения исследуемого экстракта тыквы и экстракта бархатцев концентрация  $\beta$ -амилоида уменьшилась по отношению к НК группе животных на 54,4% ( $p < 0,0002$ ) и 49% ( $p < 0,0002$ ) соответственно (рис. 2).



**Рисунок 2 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации  $\beta$ -амилоида в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.**

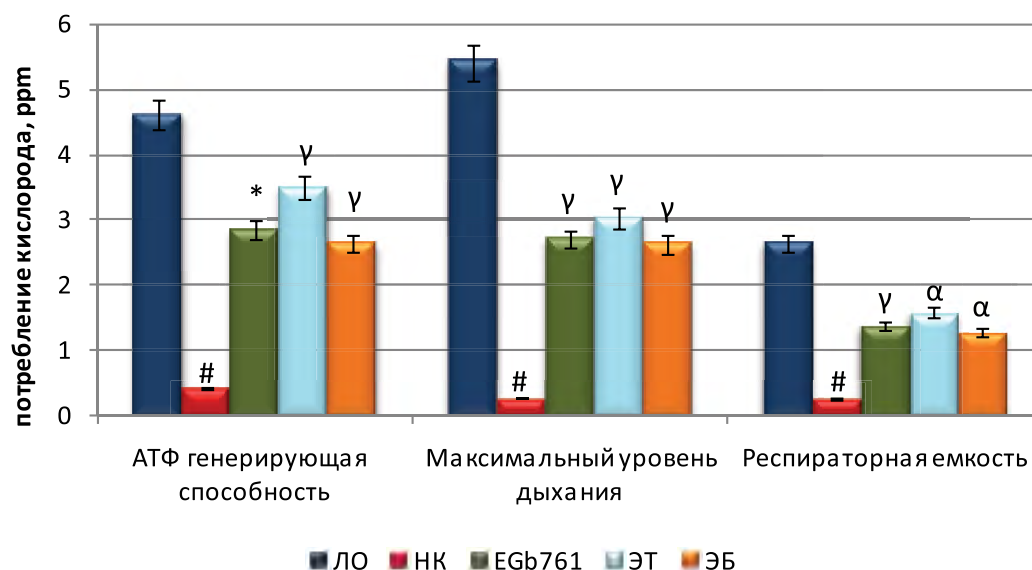
*Примечание.* ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0001$ ); \* – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0002$ ).

**Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение респирометрической функций митохондрий гиппокампа крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга**

При оценке влияния исследуемых экстрактов и EGb 761 на изменение респирометрической функции митохондрий гиппокампа установлено, что у животных НК в условиях экспериментального гипометаболизма головного мозга в сравнении с ЛО группой крыс отмечено снижение АТФ-генерирующей способности

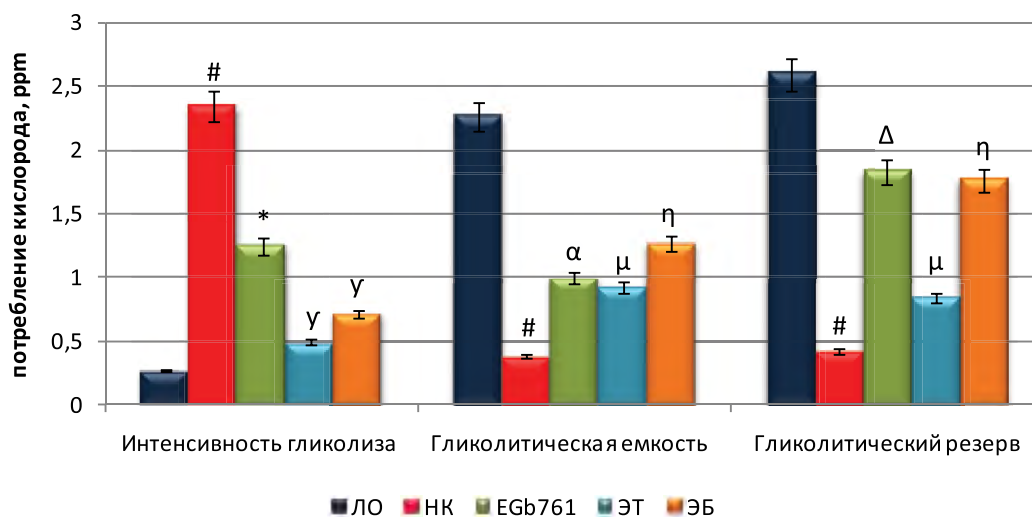
в 10,8 раза ( $p < 0,0001$ ), максимального уровня дыхания в 19,4 ( $p < 0,0001$ ) раза и респираторной емкости в 9,9 раза ( $p < 0,0001$ ) (рис. 3). При этом у животных, лишенных фармакологической поддержки, по отношению к ЛО группе крыс интенсивность гликолиза увеличилась в 8,5 раз ( $p < 0,0001$ ), а гликолитическая емкость и гликолитический резерв уменьшились в 5,8 раза ( $p < 0,0001$ ) и 6,1 раза ( $p < 0,0001$ ) соответственно (рис.4). В итоге концентрация АТФ в супернатанте гиппокампа крыс НК группы снизилась в 2,2 раза ( $p < 0,0001$ ) относительно ЛО группы крыс (рис. 5).





**Рисунок 3 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение митохондриального дыхания в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.**

Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0001$ ); статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла\* –  $p < 0,02$ ;  $\gamma$  –  $p < 0,001$ ;  $\alpha$  –  $p < 0,004$ )



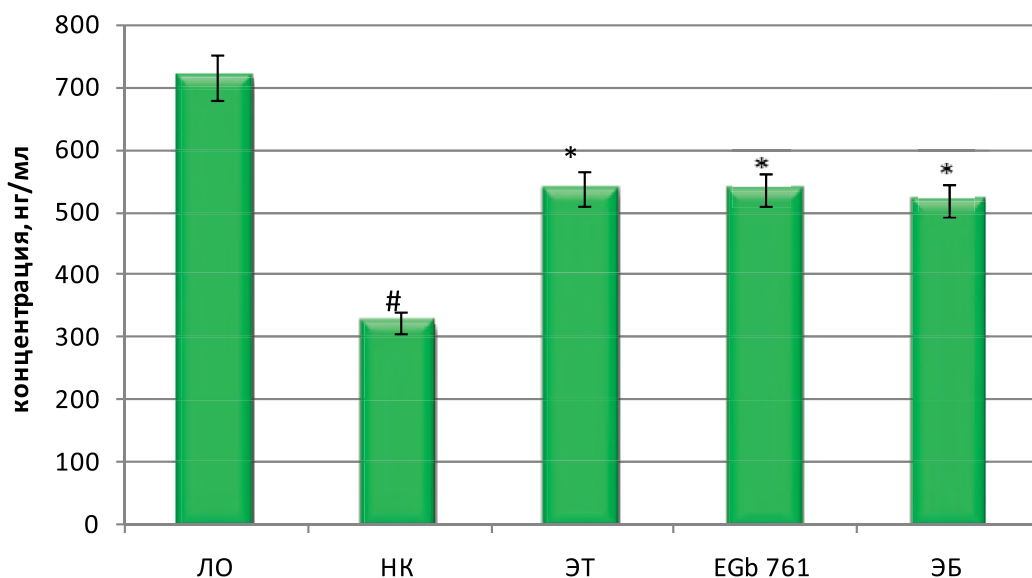
**Рисунок 4 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности анаэробных процессов в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.**

Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0001$ ); \* – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, \* –  $p < 0,005$ ;  $\gamma$  –  $p < 0,002$ ;  $\alpha$  –  $p < 0,007$ ;  $\Delta$  –  $p < 0,03$ ;  $\mu$  –  $p < 0,01$ ;  $\eta$  –  $p < 0,004$ )

На фоне введения крысам EGb 761 наблюдалось увеличение (относительно НК группы животных) АТФ-генерирующей способности (рис.3) – в 6,7 раза ( $p < 0,002$ ), максимального уровня дыхания – в 9,7 раза ( $p < 0,001$ ) и респираторной емкости – в 5,1 раза ( $p < 0,001$ ). Также у крыс, получавших EGb 761, отмечено повышение гликолитической емкости и гликолитического резерва (рис. 4) в сравнении с аналогичными показателями НК группы животных в 2,6 раза ( $p < 0,007$ ) и 4,3 раза ( $p < 0,03$ ) соответственно, при этом интенсивность гликолиза уменьшилась в 1,9 раза ( $p < 0,005$ ). Кроме того, концентрация АТФ у животных, которым вводили EGb 761 была на 65,7% ( $p < 0,002$ ) выше таковой у крыс без фармакологической коррекции.

У животных, получавших экстракт тыквы, отно-

сительно НК группы крыс наблюдалось увеличение АТФ-генерирующей способности – в 8,2 раза ( $p < 0,001$ ); максимального уровня дыхания – в 10,9 раза ( $p < 0,001$ ) и респираторной емкости – в 5,9 раза ( $p < 0,004$ ) (рис. 3). В тоже время интенсивность гликолиза у животных, которым вводили экстракт тыквы была в 4,7 раза ( $p < 0,002$ ) меньше таковой у НК группы крыс, при этом гликолитическая емкость и гликолитический резерв (рис. 4) у животных, получавших исследуемый экстракт тыквы, увеличилась в сравнении с крысами, лишенными фармакологической поддержки в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ) и 2 раза ( $p < 0,004$ ) соответственно. Также введение животным экстракта тыквы способствовало увеличению содержания АТФ (рис. 5) в гиппокампе на 66,2% ( $p < 0,002$ ) по отношению к НК группе крыс.



**Рисунок 5 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации АТФ в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.**

*Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла  $p < 0,0001$ ); \* – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,002$ )*

При применении экстракта бархатцев у животных отмечено увеличение (относительно НК группы крыс) АТФ-генерирующей способности, максимального уровня дыхания и респираторной емкости (рис. 3) в 6,2 раза ( $p < 0,001$ ); 9,4 ( $p < 0,001$ ) и 4,7 раза ( $p < 0,004$ ) соответственно. Кроме того, интенсивность гликолиза у животных, получавших экстракт бархатцев была в 3,3 раза ( $p < 0,002$ ) ниже таковой у НК группы крыс, при этом гликолитическая емкость и гликолитический резерв (рис.4) у животных, которым вводили экстракт бархатцев увеличились в сравнении с крысами, лишенными фармакологической поддержки в 3,3 ( $p < 0,01$ ) и 4,2 раза ( $p < 0,004$ ) соответственно. В итоге концентрация АТФ в гиппокампе

животных, получавших экстракт бархатцев, на 60,7% ( $p < 0,002$ ) превосходила аналогичный показатель НК группы крыс (рис.5).

#### **Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности внутреннего пути апоптоза в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга**

В ходе проведения данного блока исследования установлено, что концентрация AIF и ENDOG у животных НК группы превосходила аналогичные значения ЛО группы крыс в 3 ( $p < 0,0001$ ) и 21,7 раза ( $p < 0,002$ ) соответственно (табл.1). В тоже вре-

мя у животных, получавших EGb 761, наблюдалось снижение концентрации AIF – на 36,8% ( $p < 0,002$ ) и ENDOG – в 2,7 раза ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с группой крыс, лишенных фармакологической поддержки (табл.1). На фоне применения исследуемого экстракта тыквы у животных отмечено уменьшение (по отношению к НК группе крыс) содержания AIF и ENDOG в гиппокампе на 33% ( $p < 0,002$ ) и в 3,6 раза

( $p < 0,002$ ) соответственно. Также снижение концентрации проапоптотических маркеров внутреннего пути апоптоза наблюдалось при применении экстракта бархатцев. Так у животных, которым вводили изучаемый экстракт бархатцев, концентрация AIF и ENDOG была ниже аналогичных параметров НК группы крыс на 38,3% ( $p < 0,002$ ) и в 4,4 раза ( $p < 0,002$ ) соответственно (табл. 1).

**Таблица 1 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности внутреннего пути апоптоза в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга**

Группа	ЛО	НК	EGb761	ЭТ	ЭБ
AIF, нг/мл	6,16±0,413	18,69±0,04#	11,81±0,043*	12,61±0,426*	11,54±0,446*
ENDOG, нг/мл	72,03±1,069	1564,42±63,59#	578,41±60,45*	433,09±42,41*	352,35±10,796*

*Примечание.* AIF – апоптоз-индуцирующий фактор; ENDOG – эндонуклеаза G; ЛО – ложнопериоперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0001$ ); \* – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла,  $p < 0,0002$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что церебральный гипометаболизм является одним из предрасполагающих факторов развития БА. В экспериментальной работе Riha *et al.*, 2008 приводятся данные, что гипометаболизм задней поясной коры способствует отложению в данной структуре мозга токсичного амилоидного  $\beta$ -пептида, в результате чего у животных наблюдались характерные клинические проявления БА: снижение когнитивных функций, активация перекисного окисления липидов и снижение плотности синаптической передачи [14]. Данное исследование было дополнено Scheltens *et al.*, 2018, где было доказано, что помимо ухудшения памяти и сопряженных с ней функций головного мозга снижение интенсивности метаболических процессов способствует развитию неврологической симптоматики, моторной и сенсорной арефлексии [15]. Гипометаболизм головного мозга во многом связан с ухудшением клеточных биоэнергетических процессов, зависящих от функциональной активности митохондрий [16]. Исследования с использованием *in vitro* и *in vivo* подходов продемонстрировали, что снижение митохондриальной функции наблюдается до развития глубоких структурных изменений головного мозга, характерных для патологии Альцгеймера, и включают снижение митохондриального дыхания, экспрессии и активности метаболических ферментов, увеличение окислительного стресса и экспрессии проапоптотического сигнала [17]. При этом активация апоптотического каскада происходит в основном за счет увеличения интенсивности реакций внутреннего пути апоптоза (зависящий от митохондрий) с повышенным релизингом апоптоз-индуцирующего фактора и активацией эндонуклеазы G [18]. Индукция апоптоза в условиях развившейся патологии усиливает цитотоксичность  $\beta$ -амилоида, что ускоряет гибель нейронов и соответственно ухудшает течение заболеваний [19]. Ранее было установлено, что у по-

рядка 90% пациентов с БА отмечают явления гипометаболизма гиппокампа, при этом клинические симптомы БА сильно варьировались: от незначительных неврологических нарушений до диффузного когнитивного дефицита, сопровождаемого моторными флуктуациями и потерей сенсорного восприятия [20]. Кроме того, лица с церебральным гипометаболизмом, как правило, являются  $\beta$ -амилоид-позитивными пациентами, прогноз течения заболевания у которых наиболее неблагоприятный [21].

В связи с этим можно предположить, что коррекция гиппокампального гипометаболизма, может являться перспективным подходом к превентивной фармакотерапии БА, что частично было подтверждено в работе Villain *et al.*, 2008 [22]. Однако, несмотря на вероятную целесообразность ранней коррекции метаболических нарушений, при условии своевременной их диагностики, существующие в настоящее время, средства лечения БА, направлены на снижение цитотоксичности  $\beta$ -амилоида, а спектр соединений, применение которых способно восстановить метаболическую активность клеток, достаточно ограничен [23]. Кроме того, разрабатываемые средства целенаправленной коррекции БА зачастую обладают неблагоприятным токсикологическим профилем использования. Примером подобного средства может служить семагестат – ингибитор  $\gamma$ -секретазы, потенциально эффективный препарат для лечения БА, снижающий токсичность  $\beta$ -амилоида, обладающий, однако, высоким онкогенным потенциалом, в силу чего дальнейшее его изучение было остановлено [24].

В этой связи было проведено исследование посвященное изучению влияния экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга. Так в ходе исследования было установлено, что профилактическое введение изучаемых



экстрактов тыквы и бархатцев способствовало восстановлению митохондриальной функции и снижению интенсивности анаэробных процессов в равной степени с препаратом сравнения – стандартизованным экстрактом гинкго билоба EGb 761. При этом в группах крыс, получавших экстракт тыквы бархатцев и EGb 761, отмечено повышение концентрации АТФ в супернатанте гиппокампа по сравнению с аналогичным показателем группы крыс, лишенных фармакологической поддержки на 65,7% ( $p < 0,002$ ); 66,2% ( $p < 0,002$ ); и 60,7% ( $p < 0,002$ ) соответственно, что может свидетельствовать о нормализации биоэнергетических процессов в гиппокампе в условиях острого церебрального гипометаболизма при применении изучаемых экстрактов и препарата сравнения [25]. Кроме того, восстановление оптимального синтеза АТФ, может препятствовать дестабилизации митохондриальных мембран, что предотвращает их распад и высвобождение АИФ, угнетая тем самым внутренний апоптотический каскад реакций [26], что также было установлено в ходе данного исследования. Так при введении животным экстрактов тыквы и бархатцев наблюдалось снижение концентрации АИФ (на 33 % ( $p < 0,002$ ) и 38,3% ( $p < 0,002$ ) соответственно) и ENDOG (в 3,6 раза ( $p < 0,002$ ) и в 4,4 раза ( $p < 0,002$ ) соответ-

ственно). Также на фоне применения исследуемых экстрактов и EGb 761 отмечено снижение концентрации амилоидного  $\beta$ -пептида в гиппокампе крыс на 54,4% ( $p < 0,0002$ ); 54,4% ( $p < 0,0002$ ) и 49% ( $p < 0,0002$ ) соответственно, что в совокупности со снижением интенсивности апоптоза может предотвращать нейрональную деструкцию [27].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно предполагать, что профилактическое введение экстракта тыквы и экстракта бархатцев способствует нормализации биоэнергетических процессов, снижению концентрации проапоптотических маркеров и  $\beta$ -амилоида в гиппокампе крыс в условиях острого гипометаболизма, вызванного интрагиппокампальным введением 3М раствора натрия азида. При этом исследуемые экстракты проявляли эквивалентную терапевтическую эффективность с референтным препаратом – стандартизованным экстрактом гинкго билоба (EGb 761), что делает данные экстракты перспективными объектами для дальнейшего изучения с целью создания средств целенаправленной коррекции БА на раннем гипометаболическом этапе течения заболевания.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

### АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доценту кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов ПМФИ-филиала ВолгГМУ Серебряной Ф.К. за помощь в определении подлинности растительного сырья.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Gao C., Chang P., Yang L. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells. // *Int J Mol Med.* – 2018. – Т. 41, №1. – С. 242–250. doi:10.3892/ijmm.2017.3227
- Takahashi R.H., Nagao T., Gouras G.K. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease // *Pathol Int.* – 2017. – №67. – С. 185–193. doi: 10.1111/pin.12520.
- Chen G.F., Xu T.H., Yan Y. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacol Sin.* – 2017. – Т. 38, №9. – С. 1205–1235. doi:10.1038/aps.2017.28
- Lesné S.E., Sherman M.A., Grant M. Brain amyloid- $\beta$  oligomers in ageing and Alzheimer's disease // *Brain.* – 2013. – Т. 136, ч. 5. – С. 1383–1398. doi:10.1093/brain/awt062
- Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // *Nature.* – 2004. – Т. 430, №7000. – С. 631–639. doi:10.1038/nature02621.
- Del Prete D., Suski J.M., Oulès B. Localization and Processing of the Amyloid- $\beta$  Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Т. 55, №4. – С. 1549–1570. doi:10.3233/JAD-160953
- Lustbader J.W., Cirilli M., Lin C., Xu H.W., Takuma K., Wang N., Caspersen C., Chen X., Pollak S., Chaney M., et al. Abad directly links a beta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease // *Science.* – 2004. – № 304. – С. 448–452. doi: 10.1126/science.1091230.
- Chen X., Yan S.D. Mitochondrial abeta: A potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease // *IUBMB Life.* – 2006. – №58. – С. 686–694. doi: 10.1080/15216540601047767.
- De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe M.S. Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2012. – Т. 2, №1. – С. a006304. doi:10.1101/cshperspect.a006304
- Zhao Y., Zhang Y., Pan F. The effects of EGb761 on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in C57BL/6J mice // *Cent Eur J Immunol.* – 2015. – Т. 40, №1. – С. 11–17. doi:10.5114/ceji.2015.49427
- Гордон, Р.Я., Капралова, М.В., Годухин, О.В., Архипов, В.И. Особенности нарушений памяти у крыс после повреждения поля СА3 дорсального гиппокампа каиновой кислотой // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №6. – С. 771–775.
- Brouillet E., Hyman B.T., Jenkins B.G., Henshaw D.R., Schulz J.B., Sodhi P., Rosen B.R., Beal M.F. Systemic or

- local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism // *Experimental Neurology*. – 1994. – №129. – С. 175–182.
13. 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. – Т. 7, №1. – С. 20–31. doi:10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31
  14. Riha P.D., Rojas J.C., Colorado R.A., Gonzalez-Lima F. Animal model of posterior cingulate cortex hypometabolism implicated in amnesic MCI and AD // *Neurobiol Learn Mem*. – 2008. – Т. 90, №1. – С. 112–124. doi:10.1016/j.nlm.2008.01.011
  15. Scheltens N.M.E., van der Weijden K., Adriaanse S.M. Hypometabolism of the posterior cingulate cortex is not restricted to Alzheimer's disease // *Neuroimage Clin*. – 2018. – №19. – С. 625–632. doi:10.1016/j.nicl.2018.05.024
  16. Nicholson R.M., Kusne Y., Nowak L.A., LaFerla F.M., Reiman E.M., Valla J. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models // *Brain Res*. – 2010. – №1347. – С. 179–185. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.084
  17. Chou J.L., Shenoy D.V., Thomas N., Choudhary P.K., Laferla F.M., Goodman S.R. Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of Proteomics*. – 2011. – Т. 74, №4. – С. 466–479. doi: 10.1016/j.jprot.2010.12.012.
  18. Li Z., Chen X., Lu W. Anti-Oxidative Stress Activity Is Essential for Amanita caesarea Mediated Neuroprotection on Glutamate-Induced Apoptotic HT22 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Т. 18, №8. – С. 1623. doi:10.3390/ijms18081623
  19. Obulesu, M., Jhansi Lakshmi M. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues // *Neurochemical research*. – 2014. – Т. 39, №12. – С. 2301–2312.
  20. Chételat G., Ossenkoppele R., Villemagne V.L. Atrophy, hypometabolism and clinical trajectories in patients with amyloid-negative Alzheimer's disease // *Brain*. – 2016. №139, ч. 9. С. 2528–2539. doi:10.1093/brain/aww159
  21. Sperling R., Mormino E., Johnson K. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials // *Neuron*. – 2014. – Т. 84, №3. – С. 608–622. doi:10.1016/j.neuron.2014.10.038
  22. Villain N., Desgranges B., Viader F. Relationships between hippocampal atrophy, white matter disruption, and gray matter hypometabolism in Alzheimer's disease // *J Neurosci*. – 2008. – Т. 28, №24. – С. 6174–6181. doi:10.1523/JNEUROSCI.1392-08.2008
  23. Cummings J., Aisen P.S., DuBois B. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025 // *Alzheimers Res Ther*. – 2016. – № 8. – С. 39–51. doi:10.1186/s13195-016-0207-9.
  24. Henley D.B., Sundell K.L., Sethuraman G., Dowsett S.A., May P.C. Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings // *Curr Med Res Opin*. – 2014. – № 10. – С. 2021–2032. doi: 10.1185/03007995.2014.939167.
  25. Frenguelli B.G. The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury // *Neurochem Res*. – 2019. Т. 44, №3. – С.661–675. doi:10.1007/s11064-017-2386-6
  26. Farina B., Di Sorbo G., Chambery A. Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction // *Sci Rep*. – 2017. – Т. 7, №1. – С. 1138. doi:10.1038/s41598-017-01337-8
  27. Masters C.L., Selkoe D.J. Biochemistry of amyloid  $\beta$ -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – Т. 2, №6. – С. a006262. doi:10.1101/cshperspect.a006262

#### АВТОРЫ

**Воронков Андрей Владиславович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6638-6223. E-mail: prohor77@mail.ru.

**Поздняков Дмитрий Игоревич** – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0889-7855. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

**Аджиаметова Симилла Леонтьевна** – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ Минздрава России. E-mail: similla503@mail.ru

**Червонная Надежда Михайловна** – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры

органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ Минздрава России. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

**Мирошниченко Кирилл Александрович** – студент 5 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9811-1678. E-mail: K220436@yandex.ru

**Сосновская Анастасия Викторовна** – студентка 4 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5037-994X. E-mail: 88misi88@yandex.ru

**Шерешкова Елизавета Ивановна** – студентка 4 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7854-5401. E-mail: elizaveta.shereshkova@yandex.ru.