

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 616.831-005.4/577.127.4

Дозозависимое изучение церебропротективных свойств мальвидина**А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.А. Нигарян**

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО
ВолгГМУ Минздрава России
357532, Россия, Пятигорск, пр. Калинина, 11*

Ключевые слова: ишемия, инсульт, мексидол, холина альфосцерат, флавоноиды, мальвидин, лактат, пируват, дозозависимый эффект

Церебральная ишемия представляет собой патологическое состояние, при котором приток крови к мозгу недостаточен для удовлетворения метаболических потребностей. Это приводит к гипоксии головного мозга, некрозу мозговой ткани, инфаркту мозга или ишемическому инсульту [5,23,25].

Церебральная ишемия относится к цереброваскулярным заболеваниям (ЦВЗ), которые на сегодняшний день являются распространенными заболеваниями с высокой смертностью. Кроме того, ЦВЗ остаются важнейшей медико-социальной проблемой неврологии и всего здравоохранения. Ишемические инсульты имеют высокую частоту возникновения, что составляет более 70% от всех инсультов. Этиология инсультов клинически связана с нарушением кровообращения вследствие тромбов и/или эмбол [17,23]. Несмотря на общепризнанность того факта, что приток крови после ишемии важен для увеличения выживаемости нейронов, чтобы минимизировать повреждение мозга, сама реперфузия дополнительно усугубляет повреждение головного мозга [9,23].

Соответственно, профилактика и лечение церебральной ишемии остается основной проблемой всего научного сообщества. Актуальной тенденцией для современной фармакологии в целом является поиск средств, обладающих церебропротективной активностью в условиях ишемического инсульта. Разработка новых препаратов позволит минимизировать инвалидизацию лиц, перенесших инсульт, а также позволит осуществлять профилактику ЦВЗ населения.

Патогенез церебрального инсульта представляет собой многоступенчатый «ишемический каскад». Литературные данные свидетельствуют

о том, что в патогенез ишемического инсульта головного мозга вовлечены многочисленные факторы, в том числе изменение концентрации биомаркеров, лактат-ацидоз, метаболические нарушения, эксайтотоксичность, окислительный стресс, воспаление и чрезмерная выработка активных форм кислорода (АФК) [8,24]. Кроме того, во время ишемического повреждения головного мозга аномалии клеточного метаболизма могут происходить из-за прерванного снабжения кровью, кислородом и глюкозой, что в конечном итоге приводит к гибели нейронов или апоптозу [5].

Вещества растительного происхождения занимают особое место в качестве альтернативы для замены традиционных синтетических препаратов [6,26]. Одним из основных источников для получения лекарственных средств считаются растения. Это связано с разнообразием соединений, содержащихся в них, а также их преимуществами перед синтетическими соединениями [11,26]. Важнейшей группой растительных соединений являются флавоноиды, которые встречаются в природе в виде различных фенольных соединений [10,26]. Флавоноиды хорошо известны своей универсальной пользой для здоровья, которая в основном объясняется их антиоксидантной [4,26], противовоспалительной [20,26] и противоопухолевой активностью [16,19,26].

Ранее нами был проведен фармакологический скрининг в ряду фенольных соединений на предмет церебропротективной активности, среди которых было 16 веществ растительного происхождения, в том числе и мальвидин, который проявил наибольшую активность.

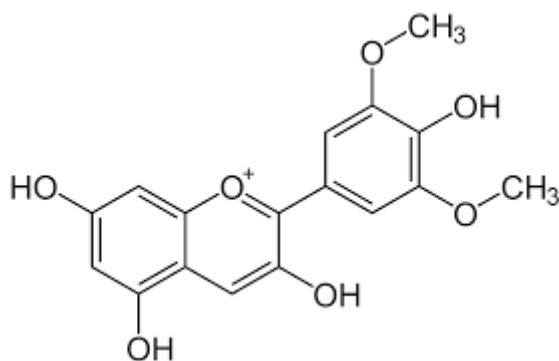


Рис. 1. Структурная формула мальвидина

Мальвидин представлен в природе главным образом как гликозилированная форма с сахарным фрагментом, расположенным в положении 3 на С-кольце, то есть мальвидин-3-глюкозид и мальвидин-3-галактозид, наибольшее количество данных соединений встречается в чернике обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*) [22]. В литературных данных описаны различные фармакологические свойства мальвидина, среди которых антиоксидантное [15], антигипертензивное (ингибирует ангиотензин-I-превраща-

щающий фермент) и противовоспалительное [7, 13]. Кроме того, обнаружено, что мальвидин может противодействовать окислительному стрессу в нейрональных клетках [14].

Целью данной экспериментальной работы было изучение дозозависимого эффекта мальвидина на предмет церебропротективной активности.

Материал и методы

Исследование было проведено на 54 крысах-самцах линии Wistar, разделенных на 9 равных групп ($n=6$). Работа с экспериментальными животными выполнялась в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986), и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Все манипуляции соответствовали национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Крысы размещались в макролоновом клетках, где в качестве подстилочного материала использовали гранулированную древесную фракцию при относительной влажности $60\pm 5\%$ и температуре воздуха $22\pm 2^\circ\text{C}$. Корм и воду животные получали в свободном доступе.

Животные предварительно были рандомизированы по возрасту (половозрелые) и массе (220-240 г). В ходе исследования были сформированы следующие экспериментальные группы: первая группа крыс – ложнооперированные (ЛО) животные, вторая группа животных – группа негативного контроля (НК), получала 0,9 % раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме. Второй и последующим группам крыс воспроизводили ишемическое повреждение головного мозга методом необратимой окклюзии правой средней мозговой артерии [1]. Третья группа получала исследуемое соединение, мальвидин, в дозировке 25 мг/кг, четвертая – 50 мг/кг, пятая – 100 мг/кг, шестая – 150 мг/кг, седьмая – 200 мг/кг. В качестве препарата сравнения был выбран мексидол (100 мг/кг, Мосхимфармпрепараты, Россия) [21] и холина альфосцерат (150 мг/кг) [18]. Препараты сравнения и исследуемое соединение в разных дозировках вводили интрагастрально на следующие сутки после воспроизведения ишемии и далее на протяжении 3 суток. По истечении указанного времени крыс декапитировали под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг) и проводили оценку изменений следующих показателей: концентрация молочной и пировиноградной кислот в сыворотке крови, величина зоны некроза. Содержание молочной и пировиноградной кислот в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом с применением стандартного набора реактивов производства НПФ «Арбис +» (Санкт-Петербург, Рос-

сия). Оценку зоны некроза производили трифенилтетразолиевым методом, в основе которого лежит изменение оптической плотности хлороформного экстракта формазана между некротизированным и интактным участком головного мозга [3].

Обработку результатов эксперимента проводили методом вариационной статистики с применением пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США для операционной системы Windows). Полученные данные проверяли нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В том случае, если данные распределения оказывались нормальными, для сравнения средних использовали ANOVA с апостериорным критерием Ньюмена-Кейсла. В случае ненормального распределения результатов опыта, дальнейшую статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

После воспроизведения фокальной ишемии головного мозга крысам, наблюдалось образование некроза мозговой ткани ($52,38 \pm 3,03\%$), что согласуется с литературными данными [12]. Кроме этого, у группы крыс НК отмечено повышение уровней образования лактата и пирувата, относительно ЛО группы на $176,85\%$ ($p < 0,05$) и $99,9\%$ ($p < 0,05$), соответственно, что свидетельствует о нарушениях метаболических функций в головном мозге, которые наблюдаются при острых нарушениях мозгового кровообращения [2] (табл., рис.).

Таблица

Изменение концентрации лактата и пирувата после воспроизведения церебральной ишемии головного мозга крыс и на фоне введения референтных препаратов и мальвидина в различных дозировках

Группы крыс	Исследуемый показатель	
	лактат, ммоль/л	пируват, мкмоль/л
ЛО	$1,08 \pm 0,1$	$100,38 \pm 1,44$
НК	$2,99 \pm 0,024$	$200,68 \pm 15,60$
Мексидол 100 мг/кг	$2,57 \pm 0,161^*$	$116,0 \pm 4,986^*$
Холина альфосцерат 150 мг/кг	$2,05 \pm 0,046^*$	$151,76 \pm 18,818^*$
Мальвидин 25 мг/кг	$2,52 \pm 0,177$	$287,29 \pm 22,238$
Мальвидин 50 мг/кг	$2,41 \pm 0,048$	$230,16 \pm 9,086$
Мальвидин 100 мг/кг	$2,15 \pm 0,143^*$	$106,64 \pm 3,190^*$
Мальвидин 150 мг/кг	$2,52 \pm 0,168$	$282,67 \pm 37,137$
Мальвидин 200 мг/кг	$2,47 \pm 0,109$	$304,46 \pm 11,258$

Примечание: ЛО – группа ложнооперированных крыс, НК – группа крыс негативного контроля; * статистически значимо относительно группы животных НК (критерий Ньюмена-Кейсла; $p < 0,05$)

При введении крысам мексидола (100мг/кг) отмечалось улучшение исследуемых биохимических показателей относительно группы крыс НК (снижение лактата в крови на 16,3 %, пирувата – на 73% ($p<0,05$), а также уменьшение зоны некроза головного мозга у животных на 83,5% ($p<0,05$). На фоне введения холина альфосцерата также было улучшение метаболических процессов в головного мозга по сравнению с группой животных НК, которое выражалось в уменьшении образования лактата (45,85%; $p<0,05$) и пирувата (32,23%; $p<0,05$). Степень некроза мозговой ткани крыс холина альфосцерат снижал на 109,8% ($p<0,05$) относительно группы крыс НК (табл., рис.).

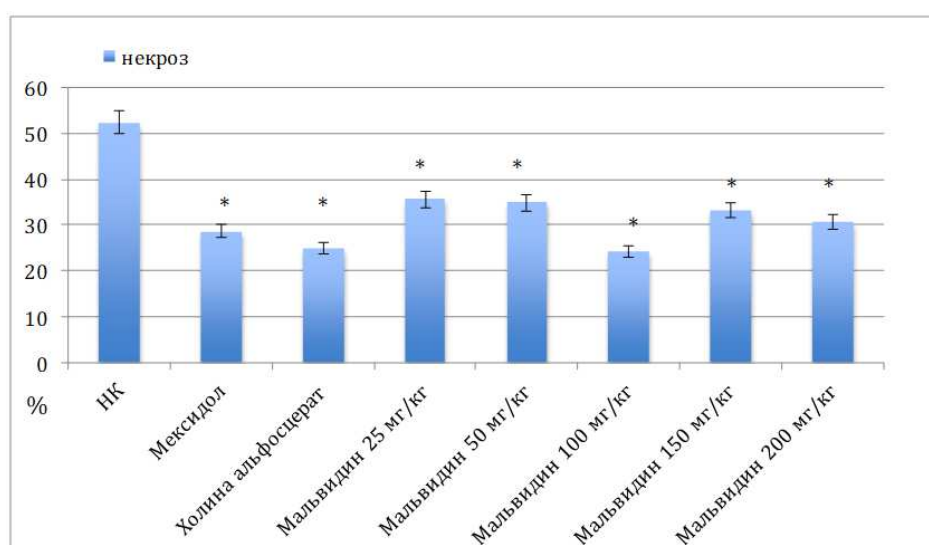


Рисунок. Влияние мальвидина на степень некроза в разной дозировке
* статистически значимо относительно НК группы крыс
(критерий Ньюмена-Кейсла; $p<0,05$)

После введения мальвидина животным в минимально выбранной дозировке (25 мг/кг) было отмечено снижение лактата в крови на 16,34% ($p<0,05$) относительно группы крыс НК. При введении крысам мальвидина в дозировке 50 мг/кг наблюдалось уменьшение лактата в сыворотке крови на 24,06% ($p<0,05$) в сравнении с группой крыс НК. Введение мальвидина животным в дозировках 150 мг/кг и 200 мг/кг вызывало снижение уровня лактата в сравнении с группой животных НК на 18,65% ($p<0,05$) и 21,05% ($p<0,05$), соответственно. При этом введение мальвидина крысам в дозировках 25 мг/кг, 50 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг не вызывало уменьшения образования пирувата в сыворотке крови крыс.

Введение крысам мальвидина в пяти разных дозировках (25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг) показало, что максимальный

эффект мальвидин проявляет в дозировке 100 мг/кг, что подтверждалось влиянием на все исследуемые показатели. Так, введение крысам мальвидина в дозировке 100 мг/кг вызывало снижение концентрации лактата и пирувата на 39,07% ($p < 0,05$) и 88,2% ($p < 0,05$) относительно группы крыс НК. Следовательно, по сравнению с мексидолом, мальвидин снижал степень образования лактата и пирувата на 19,5% ($p < 0,05$) и 8,8% ($p < 0,05$) больше. По сравнению с группой крыс, которой вводили холина альфосцерат, введение мальвидина вызывало снижение образования пирувата на 42,3% ($p < 0,05$) больше. По влиянию на уровень образования лактата, статистически значимых отличий при сравнении мальвидина и холина альфосцерата не отмечено (табл., рис.).

Проведенное нами исследование по изучению дозозависимой церебропротективной активности мальвидина показало, что максимальный церебропротективный эффект мальвидин проявлял в дозировке 100 мг/кг. Так, относительно группы животных, получавших мексидол, мальвидин понижал образование лактата и пирувата на 19,5% ($p < 0,05$) и 8,8% ($p < 0,05$) больше. По сравнению с группой крыс, которой вводили холина альфосцерат, введение мальвидина вызывало снижение образования пирувата на 42,3% ($p < 0,05$) больше.

Таким образом, результаты нашей экспериментальной работы свидетельствуют о перспективности дальнейшего углубленного изучения церебропротективной активности мальвидина в дозировке 100 мг/кг с целью выяснения потенциального механизма действия данного соединения.

Поступила 03.05.19

Մալվիդինի ցերեբրոպրոտեկտային հատկությունների չափաբաժնային կախվածության ուսումնասիրությունը

Ա.Վ. Վորոնկով, Դ.Ի. Պոզդնյակով, Ս.Ա. Նիզարյան

Աշխատանքում ներկայացված են փորձնական հետազոտության արդյունքները, որոնց նպատակը մալվիդին բնական միացության ցերեբրոպրոտեկտային ակտիվության չափաբաժնային կախվածության ազդեցության հետազոտումն է: Փորձերը կատարվել են Wistar արու առնետների վրա: Ֆոկալ իշեմիան վերարտադրվել է միջին ուղեղային արտերիայի թերմոկոագուլյացիայի անդարձելի մեթոդի կիրառմամբ: Որպես համեմատական պատրաստուկ՝ փորձերի ընթացքում օգտագործվել են մեքսիդոլ (100 մգ/կգ) և խոլինա ալֆասցերատ (100 մգ/կգ): Ուսումնասիրված միացությունը կենդանիներին ներարկվել է երեք օրվա ընթացքում ինտրազաստրային եղանակով տարբեր չափաբա-

ծիններով՝ 25 մգ/կգ, 50 մգ/կգ, 200 մգ/կգ: Մալվիդինի չափաբաժնային կախվածության ակտիվությունն ուսումնասիրվել է կենսաքիմիական թեստերով (չափվել են արյան շիճուկում լակտատի և պիրուվատի կոնցենտրացիաները), ինչպես նաև միացության ազդեցության հավանականությունը գլխուղեղի նեկրոզի առաջացման վրա: Մեր հետազոտության արդյունքում բացահայտվել է, որ առավել ցայտուն ցերեբրոպրոտեկտային ակտիվությունը դրսևորվում է չափաբաժնի դեպքում: Սա նախապայմաններ է ստեղծում մալվիդինի 100 մգ/կգ չափաբաժնի ցերեբրոպրոտեկտային ակտիվության հետազոտությունների հետագա խորացման համար:

Dose-Dependent Study of Malvidin Cerebroprotective Properties

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.A. Nigaryan

The paper presents the results of experimental work, the purpose of which was to study the dose-dependent effect of the natural Malvidin compound on cerebroprotective activity. The study was conducted on 54 Wistar male rats. Focal ischemia was reproduced by the method of irreversible thermocoagulation of the middle cerebral artery. Mexidol (100 mg / kg) and Choline alphoscerate (100 mg / kg) were used as reference agents in the experiment. The tested compound was administered intragastrally to animals for three days in various dosages: 25 mg / kg, 50 mg / kg, 100 mg / kg, 150 mg / kg and 200 mg / kg. Malvidin's dose-dependent cerebroprotective activity was studied in biochemical tests (the concentration of lactate and pyruvate in the serum was measured), as well as the effect of the compound on the degree of necrosis of the brain. As a result of our study, it was found that Malvidin showed the most pronounced cerebroprotective effect at a dosage of 100 mg / kg. This creates the prerequisites for further in-depth study of the cerebroprotective properties of Malvidin at a dosage of 100 mg / kg.

Литература

1. 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.
2. Завалий Л.Б., Петриков С.С., Щеголев А.В. Метаболическая терапия при ишемическом инсульте. Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь», 2018, т.7, 1, с. 44-52. DOI:10.23934/2223-9022-2018-7-1-44-52.
3. Назарова Л.Е., Дьякова И.Н. Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии. Медицинский вестник Башкортостана, 2011, 3, с.133-135.

4. *Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J. P., and Mason T. J.* Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 11, no. 3-4, p. 261–265, 2004.
5. *Dong Q., Lin X., Shen L., Feng Y.* The protective effect of herbal polysaccharides on ischemia-reperfusion injury. *Int J Biol Macromol.*, 2016, Nov. 92:431-440. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.07.052.
6. *Fahmy N. M., Al-Sayed E., El-Shazly M., and Singab A. N.* “Comprehensive review on flavonoids biological activities of *Erythrina* plant species,” *Industrial Crops and Products*, vol. 123, p. 500–538, 2018.
7. *Huang W. Y., Wang J., Liu Y. M., Zheng Q. S., and Li C.Y.*, “Inhibitory effect of Malvidin on TNF- α -induced inflammatory response in endothelial cells,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 723, no. 1, p. 67–72, 2014.
8. *Ju J., Wu J., Hou R.* Role of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in estrogen-mediated protection following flap ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct.*, 2016, Oct.34(7):522-530. DOI: 10.1002/cbf.3226.
9. *Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M., Korthuis R.J.* Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317. DOI:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.
10. *Kumar S. and Pandey A. K.*, “Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview,” *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages, 2013.
11. *Lahlou M.*, “Screening of natural products for drug discovery,” *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 2, no. 5, p. 697–705, 2007.
12. *Lambertsen K.L., Finsen B., Clausen B.H.* Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? *Acta Neuropathologica*, 2018, p.1-22. DOI: 10.1007/s00401-018-1930-z.
13. *Lee C., Han D., Kim B., Baek N., and Baik B. K.*, “Antioxidant and anti-hypertensive activity of anthocyanin-rich extracts from hullless pigmented barley cultivars,” *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no. 5, p. 984–991, 2013.
14. *Matsunaga N., Imai S., Inokuchi Y. et al.*, “Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage in vitro and in vivo,” *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 53, no. 7, p. 869–877, 2009.
15. *Pop R., Ștefănuț M. N., Căta A., Tănasie C., and Medeleanu M.*, “Ab initio study regarding the evaluation of the antioxidant character of cyanidin, delphinidin and malvidin,” *Central European Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 1, p. 180–186, 2012.
16. *Raffa D., Maggio B., Raimondi M. V., Plescia F., and Daidone G.*, “Recent discoveries of anticancer flavonoids,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 142, p. 213–228, 2017.
17. *Rao P.R., Kumar V.K., Viswanath R.K., Subbaraju G.V.* Cardioprotective activity of alcoholic extract of *Tinospora cordifolia* in ischemia-reperfusion induced myocardial infarction in rats. *Biol Pharm Bull.*, 2005, Dec. 28(12):2319-22.
18. *Shul'ginova A.A., Laskov V.B., Konoplya A.I., Karaulov A.V.* Pharmacological correction of red blood cell membrane lipid spectrum in patients with chronic cerebral ischemia on the background of hypertensive disease // *Eksp Klin Farmakol*, 2016, vol.79, №7, p.3-7.
19. *Souza P. O. d., Bianchi S. E., Figueiró F. et al.*, “Anticancer activity of flavonoids isolated from *achyrocline satureioides* in gliomas cell lines,” *Toxicology in Vitro*, vol. 51, p. 23–33, 2018.
20. *Spagnuolo C., Moccia S., and Russo G. L.*, “Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 153, p. 105–115, 2018.
21. *Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I.* Endothelotropic activity of 4-hydroxy-3, 5-di-tert-butylcinnamic acid in the conditions of experimental cerebral ischemia // *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology*, 2018, vol.4, №2, p. 1-10. DOI: 10.3897/rrpharmacology.4.26519.

-
22. Wuyang Huang, Yunming Zhu, Chunyang Li, Zhongquan Sui, and Weihong Min. Effect of Blueberry Anthocyanins Malvidin and Glycosides on the Antioxidant Properties in Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2016, Article ID 1591803, 10 pages. DOI:10.1155/2016/1591803
 23. Xing P, Ma K, Wu J, Long W, Wang D. Protective effect of polysaccharide peptide on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Dec., 18(6):5371-5378. DOI: 10.3892/mmr.2018.9579.
 24. Xu M., Wang H.F., Zhang Y.Y., Zhuang H.W. Protection of rats spinal cord ischemia-reperfusion injury by inhibition of MiR-497 on inflammation and apoptosis: Possible role in pediatrics. *Biomed Pharmacother.*, 2016, Jul., 81:337-344. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.04.028.
 25. Yamashita T., Abe K. Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant.*, 2016, 25(5):893-8. DOI: 10.3727/096368916X690548.
 26. Zaizhi L., Lingtao K., Shunbao L., and Zhengrong Zou. Application of a Combined Homogenate and Ultrasonic Cavitation System for the Efficient Extraction of Flavonoids from *Cinnamomum camphora* Leaves and Evaluation of Their Antioxidant Activity In Vitro. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2019, Article ID 4892635, 12 pages. DOI:10.1155/2019/4892635.