

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Научная статья

Зацепина Е.Е.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0002-0511-0220;

<sup>1</sup> Пятигорский медико-фармацевтический институт, Пятигорск, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (angel\_l-11-21[at]mail.ru)

**Аннотация**

В настоящее время одна из самых востребованных групп – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Элативный контингент назначения данных средств – это пожилые люди, возрастные пациенты, которые достаточно часто и продолжительно используют НПВП, что позволило задуматься о проведении анализа и поиска связи между НПВП и болезнью Альцгеймера. Проведенные научные наблюдения вербализовали взаимосвязь болезни Альцгеймера и НПВП, и выдвинули гипотезу о новации терапевтической перспективы. С этой целью было проведено исследование влияния НПВП на активность митохондриальных ферментов (аконитазы, цитратсинтазы и альфа-кетоглутаратдегидрогеназы) в гиппокампе экспериментальных животных при моделировании болезни Альцгеймера. Для изучения были выбраны препараты из группы нестероидные противовоспалительные: индометацин, ибупрофен, целекоксиб, немисулид и ацетилсалициловая кислота.

**Ключевые слова:** эксперимент, крысы, болезнь Альцгеймера, НПВС, индометацин, ибупрофен, целекоксиб, немисулид, ацетилсалициловая кислота.

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF SOME NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THE ACTIVITY OF MITOCHONDRIAL ENZYMES IN A MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Research article

Zatsepina Y.Y.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ORCID : 0000-0002-0511-0220;

<sup>1</sup> Pjatigorsk medizinisch-pharmazeutisches Institut, Pyatigorsk, Russian Federation

\* Corresponding author (angel\_l-11-21[at]mail.ru)

**Abstract**

Nowadays, one of the most popular groups is non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The relative target population of prescribing these drugs is elderly people, age patients, who use NSAIDs often enough and for a long time, which made it possible to think about analysing and searching for the relationship between NSAIDs and Alzheimer's disease. The scientific observations made verbalized the relationship between Alzheimer's disease and NSAIDs, and hypothesized the novelty of the therapeutic perspective. To this end, the effect of NSAIDs on the activity of mitochondrial enzymes (aconitase, citrate synthase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase) in the hippocampus of experimental animals in a model of Alzheimer's disease was examined. Drugs from the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs: indomethacin, ibuprofen, celecoxib, nemisulide and acetylsalicylic acid were chosen for the study.

**Keywords:** experiment, rats, Alzheimer's disease, NSAIDs, indomethacin, ibuprofen, celecoxib, nemisulide, acetylsalicylic acid.

**Введение**

В современном мире одна из самых востребованных групп отпускаемых в аптеке по рецепту и без рецепта – это нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) [1]. Часто отпуск данной группы сопряжен не только с назначением врача, но и с ответственным самолечением, которое выбирает для себя сам человек. Актуальность и феноменальный спрос потребителей продиктованы полимодальной активностью, способностью ослаблять проявления «типичных» патофизиологических расстройств (болевая реакция, воспалительный синдром), понятность и доступность применения для пациента. Обширная номенклатура как оригинальных, так дженерических препаратов позволяет клиническим специалистам подобрать наиболее эффективный препарат в зависимости от степени проявления деструкций патологического процесса. Свыше трех десятков миллионов каждый год используют НПВП, 50% этих людей имеют возраст старше 60 лет, потому что у пожилых пациентов чаще и острее проявляются скелетно-мышечные, нейрогенные, воспалительные и другие виды боли [1]. Мировые прогнозы говорят, только о возрастании потребности человечества в этой группе по мере общего старения населения в развитых странах мира. Ввиду того, что НПВП назначаются и применяются пожилыми людьми достаточно часто и отчасти продолжительно создались предпосылки для анализа и поиска связи между приемом нестероидных противовоспалительных средств и болезнью Альцгеймера [1], [2], [3]. В какой-то мере первые исходные эмпирические наблюдения были случайны и хаотичны. Но со временем детальное изучение и фиксирование результатов терапии привели многих авторов к пониманию того, что низкая частотность болезни Альцгеймера наблюдается у пациентов, принимающих с целью обезболивания препараты из группы нестероидных противовоспалительных по сравнению с показателями из общей популяции. Последующие научные наблюдения более конструктивно сформулировали взаимосвязь болезни Альцгеймера и НПВП и выдвинули гипотезу о новации терапевтической перспективы [2], [4], [5].

**Цель, методы и принципы исследования**

С этой целью вызвало интерес проведение исследования влияния НПВП на активность митохондриальных ферментов (аконитазы, цитратсинтазы и альфа-кетоглутаратдегидрогеназы) в гиппокампе экспериментальных животных при моделировании болезни Альцгеймера [6]. Для изучения были выбраны препараты из группы нестероидные противовоспалительные: индометацин, ибупрофен, целекоксиб, нимесулид и ацетилсалициловая кислота.

Условия содержания экспериментальных животных отвечало регламентирующим правилам GLP (good laboratory practice) от 01.03.2010 РФ и Приказу МЗ РФ № 267 от 29.03.2003 г. [7].

Дизайн исследования:

Крысы (линия Wistar), масса одного животного в пределах 240-260 грамм.

Моделирование болезни Альцгеймера: в гиппокамп (сектор CA1, по разделению Lorente de No) было произведено введение раствора, содержащего фрагмент бета-амилоида 1-42 (2мкл, концентрация 1ммоль/л), предварительно охлажденного (фосфатно-солевой буфер, pH=7,4) при постоянном плавном перемешивании (36ч), доводя до состояния белковых структур (фибриллярные агрегаты) [8]. Экспериментальных животных подвергали наркотизированию (хлоралгидрат, в/б, 350мг/кг), область темени скальпировалась и вводился фрагмент бета-амилоида 1-42 (5мкл). В дальнейшем, спустя 5 минут игла микродозатора извлекалась, скальпированная часть темени зашивалась и обрабатывалась раствором для наружного использования (10% поливинилпирролидон йод).

Сформированы группы:

Контроль, представлял собой группу экспериментальных животных с моделированной патологией не получавших исследуемые препараты, а только эквивалент физиологического раствора.

Ложнопрооперированные – группа экспериментальных животных, подвергшихся оперативным манипуляциям, но без моделирования патологии.

- Индометацин 4,2 мг/кг.

- Ибупрофен 34,2 мг/кг.

- Целекоксиб 8,6 мг/кг.

- Нимесулид 8,6 мг/кг.

- Ацетилсалициловая кислота 8,6мг/кг.

Исследуемые препараты вводили «per os» курсом 60 дней от начала моделирования болезни Альцгеймера.

По истечении 60 дней гиппокамп извлекался, гомогенизировался и центрифугировался с целью выделения фракции митохондрий.

Продуктивность исследуемой фракции митохондрий проводили по анализу содержания цитратсинтазы, аконитазы и альфа-кетоглутаратдегидрогеназы.

О продуктивности альфа-кетоглутаратдегидрогеназы судили по выраженности восстановительной реакции никотинамидадениндинуклеотида (340 нм), при участии тиаминпирозинфосфата и альфа-кетоглутарата. Продуктивность аконитазы изучали так же благодаря спектрофотометрическому методу (340 нм), посредством определения никотинамидадениндинуклеотидфосфата, который образовался в ходе сопряжения аконитаза-изоцитратдегидрогеназной реакции. Продуктивность цитратсинтазы оценивалась спектрофотометрически обнаружением соединений окрашивания регресс-реакции 5,5-дителибис-2-нитробензойной кислоты при участии ацетил-коэнзим А и оксалоацетата (412 нм).

Методология статистической обработки учитывала вариацию (пакет программ Statistika 6,0): тест Шапиро- Уилка (нормальная сегрегация при распределении результатов); пост-тест Ньюмена-Кейсла (нормальная сегрегация при распределении результатов в условиях значимых статистических отличий); тест Левена (однородность дисперсий).

Вся экспериментальная модуляция регламентировалась предписанием 2010/63/EU [8].

### **Основные результаты и обсуждение**

Есть несколько теорий формирования патологических отклонений и дегенеративных изменений нейрональной системы мозга [6], [9]. Выделяют преимущественно: искажения метаболического обмена амилоида (амилоидный путь), вследствие преобладания патологической деформации протекания воспалительной реакции. Сам по себе амилоид (амилоидные фибриллы) естественный элемент клеточной плазматической мембраны, но под влиянием альфа и бета секретаз возможен деструктивный каскад, который завершается клеточным апоптозом [4], [10], [11], [12].

В патогенезе деструктивного воспаления основная роль отводится ферменту циклооксигеназе (ЦОГ), которая может быть конституционной, так называемой ЦОГ-1, для физиологической потребности восполнения синтеза простагландинов, но при возрастании концентрации в очаге патологии синтезируется ЦОГ-2, усугубляющая тяжесть протекания воспалительного ответа. Поэтому вполне закономерно рассматривать группу нестероидных противовоспалительных препаратов как возможность повлиять на течение болезни Альцгеймера.

Полученные экспериментальные данные говорят о заметном снижении инициативности цитратсинтазы, аконитазы и альфа-кетоглутаратдегидрогеназы во фракции митохондрий гиппокампа крыс группы «контроль» как относительно экспериментальных групп, так и относительно группы ложнопрооперированных крыс. Продуктивность цитратсинтазы повысилась при введении индометацина на 26,5%, ибупрофена на 19,1%, ацетилсалициловой кислоты на 25,0%, нимесулида на 8,8% и целекоксиба на 5,8% относительно контрольной группы. Продуктивность аконитазы возросла при введении индометацина, ибупрофена, ацетилсалициловой кислоты, нимесулида на 200% и целекоксиба на 150% относительно контрольной группы. Каталитические функции альфа-кетоглутаратдегидрогеназы стали более продуктивны при введении индометацина на 40,3%, ибупрофена на 42,6%, ацетилсалициловой кислоты на 42,4%, целекоксиба на 35,0% и нимесулида на 31,8% относительно контрольной группы.

Предполагаемый механизм действия стимуляции активности митохондриального матрикса ферментов связан со способностью НПВП сдвигать биохимические процессы воспалительного ответа в сторону подавления динопростона (простагландин E2) и влиять на гамма-секретазу, что соответственно угнетает образования амилоидного белка (Aβ-42) или сдерживать формирование складчатой-β структуры [9], [10], [11]. Наиболее выраженный эффект наблюдается при введении ацетилсалициловой кислоты, индометацина и ибупрофена. Это действие на модулярно-

нейромедиаторные системы мозга обусловлено предположительно неселективным ингибированием циклооксигеназы. Перспективность благоприятного терапевтического эффекта при болезни Альцгеймера у ацетилсалициловой кислоты более выражена, предположительно потому что в качестве антиагреганта данный препарат назначается пожилым людям превентивно, для поддержания физиологической работы сердечно-сосудистой системы в малых дозах продолжительным курсом. Что касается немисулида и целекоксиба, то они подавляют в большей степени циклооксигеназу 2, угнетая синтез простагландинов. Возможно, для более выраженного терапевтического эффекта по предотвращению дегенерации нейронов мозга следует рассмотреть более длительное назначение в малых дозах.

Таблица 1 - Влияние исследуемых веществ на активность тканевых митохондриальных ферментов гиппокампа крыс

Группа животных	Цитратсинтаза Ед/мг белка	Аконитаза Ед/мг белка	Альфа- кетоглутаратдегидроге- наза Ед/мг белка
Ложнопрооперирован- ные	22,6±0,7	1,4±0,02	255,9±6,7
Контроль	6,8±1,0	0,2±0,01	52,6±9,5
Индометацин	8,6±0,5#*	0,6±0,03#*	73,8±11,2#*
Ибупрофен	8,1±0,3#	0,6±0,02*	75,0±9,4
Целекоксиб	7,2±0,9*	0,5±0,04#	71,5±7,3*
Немисулид	7,4±0,7	0,6±0,03	69,3±11,2#
Ацетилсалициловая кислота	8,5±0,6#*	0,6±0,04#*	74,9±7,9#*

Примечание: экспериментальная болезнь Альцгеймера; #  $p < 0,05$ , относительно группы ложнопрооперированных; \* $p < 0,05$ , относительно группы контроля

Активность фермента цитратсинтазы изменилась при введении индометацина и ацетилсалициловой кислоты в 0,7 раз, у ибупрофена в 0,8 раз, у целекоксиба и немисулида в 0,9 раз в сравнении с контрольной группой. В контрольной группе прослеживается снижением активности митохондриальных ферментов.

Активность аконитазы изменилась при введении индометацина, ацетилсалициловой кислоты, ибупрофена и немисулида в 0,3 раза, целекоксиба 0,4 раза в сравнении с контрольной группой.

Активность фермента альфа-кетоглутаратдегидрогеназы изменилась примерно одинаково при ведении всех исследуемых препаратов в 0,7 раз в сравнении с контрольной группой.

Во всех экспериментальных группах, а особенно в группе контрольной в сравнении с группой ложнооперированных экспериментальных животных наблюдалось снижение активности анализируемых ферментов.

#### Заключение

Сложность выстраивания четкого клинического патогенеза развития болезни Альцгеймера связана с мультифакторностью вовлечения в дегенеративно-деструктивный процесс клеток головного мозга разнообразных функционалов нервной системы [3], [5]. И с позиции предотвращения нарушения перекисного окисления (образования свободных травмирующих радикалов) липидов в процессе воспалительных реакций (как типовых, так и патологических) посредством подавления синтеза циклооксигеназы и динопростона, повышение активности цитратсинтазы и альфа-кетоглутаратдегидрогеназы закономерно рассматривать НПВП [2], [3], [9], [12]. Проведенное экспериментальное исследование показало, что группа НПВС способна влиять на биохимических процессы, связанные с активностью митохондриальных ферментов, а именно повышать инициативность в сравнении с группой экспериментальных животных, не получивших фармакологическое содействие при моделированной патологии. Предположительно можно высказать заключение, что малые дозы длительного приема ацетилсалициловой кислоты в качестве антиагреганта для профилактики сердечно-сосудистых патологий способны снижать риски развития болезни Альцгеймера у пожилых пациентов. Но важно отметить, что данное направление в терапии является новым и требует дополнительных исследований.

#### Конфликт интересов

Не указан.

#### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

#### Conflict of Interest

None declared.

#### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

#### Список литературы / References

1. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы / Е.Л. Насонов // Русский медицинский журнал. — 2002. — Т. 10. — № 4(148). — С. 206-212.

2. Амбарцумян Е.Р. Сравнительный анализ потенциала взаимодействия дигидроартемизинина, димера дигидроартемизинина и ибупрофена с  $\beta$ -амилоидной фибриллой бace-1 методами молекулярного моделирования / Е.Р. Амбарцумян, С.В. Гиносян, С.Г. Тирацун // Вестник российско-армянского (славянского) университета: физико-математические и естественные науки. — 2020. — № 2. — С. 113-121.

3. Букатина Е.Е. Эффективность амиридина при сенильной деменции альцгеймеровского типа / Е.Е. Букатина, И.В. Григорьева, Е.И. Соколыч // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1991. — Т. 91. — № 9. — С. 53-58.

4. Кухарский М.С. Молекулярные аспекты патогенеза и современные подходы к фармакологической коррекции болезни Альцгеймера / М.С. Кухарский, Р.К. Овчинников, С.О. Бачурин // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2015. — № 6. — С. 103-114.

5. Акшулаков С.К. Болезнь Альцгеймера, патоморфология, клинические проявления и современное лечение / С.К. Акшулаков, Ж.Т. Такенов, С.Д. Карибай // Нейрохирургия и неврология Казахстана. — 2015. — № 2(39). — С. 26-33.

6. Левин О.С. Современные подходы к диагностике и лечению смешанной деменции / О.С. Левин // Трудный пациент. — 2014. — № 5. — С. 40-46.

7. Каркищенко Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н.Н. Каркищенко; под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. — М.: Профиль-2С, 2010. — 358 с.

8. Белозерцева И.В. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных / И.В. Белозерцевой; под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. — М.: ИРБИС, 2017. — 336 с.

9. Поздняков Д.И. Влияние соединений, содержащих 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенильную группировку, на активность митохондриальных ферментов и содержание тау-белка в гиппокампе крыс на экспериментальной модели болезни Альцгеймера / Д.И. Поздняков, Е.Е. Зацепина, А.В. Арльт // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2022. — Т. 85. — № 6. — С. 48-52.

10. Парфенов В.А. Профилактика и лечение болезни Альцгеймера / В.А. Парфенов // Медицинский совет. — 2014. — № 18. — С. 20-26.

11. Шелковникова Т.А. Протеинопатии - формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков / Т.А. Шелковникова, А.А. Куликова, Ф.О. Цветков [и др.] // Молекулярная биология. — 2012. — № 46(3). — С. 402-415.

12. Шевцова Е.Ф. Влияние фрагмента бета-амилоидного пептида 25-35 на неселективную проницаемость митохондрий / Е.Ф. Шевцова, Е.Г. Киреева, С.О. Бачурин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2001. — № 132(12). — С. 652-656.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Nasonov E.L. Primenenie nesteroidnyh protivovospalitel'nyh preparatov: terapevticheskie perspektivy [Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs: therapeutic perspectives] / E.L. Nasonov // Russkij medicinskij zhurnal [Russian Medical Journal]. — 2002. — Vol. 10. — № 4(148). — P. 206-212. [in Russian]

2. Ambarcumjan E.R. Sravnitel'nyj analiz potentsiala vzaimodejstviya digidroartemizinina, dimera digidroartemizinina i ibuprofena s  $\beta$ -amiloidnoj fibrilloji bace-1 metodami molekularnogo modelirovaniya [A Comparative analysis of the interaction potential of dihydroartemisinin, dihydroartemisinin dimer and ibuprofen with  $\beta$ -amyloid fibril bace-1 by molecular modelling methods] / E.R. Ambarcumjan, S.V. Ginosjan, S.G. Tiracujan // Vestnik rossijsko-armjanskogo (slavjanskogo) universiteta: fiziko-matematicheskie i estestvennye nauki [Bulletin of the Russian-Armenian (Slavic) University: Physical, Mathematical and Natural Sciences]. — 2020. — № 2. — P. 113-121. [in Russian]

3. Bukatina E.E. Jefferktivnost' amiridina pri senil'noj demencii al'cgejmerovskogo tipa [Efficacy of amiridine in senile dementia of the Alzheimer type] / E.E. Bukatina, I.V. Grigor'eva, E.I. Sokol'chik // Zhurnal nevropatologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova [Journal of Neuropathology and Psychiatry named after S.S. Korsakov]. — 1991. — Vol. 91. — № 9. — P. 53-58. [in Russian]

4. Kuharskij M.S. Molekuljarnye aspekty patogeneza i sovremennye podhody k farmakologicheskoj korrekcii bolezni Al'cgejmera [Molecular aspects of pathogenesis and modern approaches to pharmacological correction of Alzheimer's disease] / M.S. Kuharskij, R.K. Ovchinnikov, S.O. Bachurin // Zhurnal nevropatologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova [Journal of Neuropathology and Psychiatry named after S.S. Korsakov]. — 2015. — № 6. — P. 103-114. [in Russian]

5. Akshulakov S.K. Bolezn' Al'cgejmera, patomorfologija, klinicheskie projavlenija i sovremennoe lechenie [Alzheimer's disease, pathomorphology, clinical manifestations and current treatments] / S.K. Akshulakov, Zh.T. Takenov, S.D. Karibaj // Nejrohirurgija i nevrogologija Kazahstana [Neurosurgery and neurology in Kazakhstan]. — 2015. — № 2(39). — P. 26-33. [in Russian]

6. Levin O.S. Sovremennye podhody k diagnostike i lecheniju smeshannoju demencii [Modern approaches to the diagnosis and treatment of mixed dementia] / O.S. Levin // Trudnyj pacient [Difficult patient]. — 2014. — № 5. — P. 40-46. [in Russian]

7. Karkishhenko N.N. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomedicinskih issledovaniyah [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical research] / N.N.Karkishhenko; ed. by N.N.Karkishhenko, S.V.Grachev. — М.: Profil'-2S, 2010. — 358 p. [in Russian]

8. Belozerceva I.V. Rukovodstvo po sodержaniju i ispol'zovaniju laboratornyh zhivotnyh [Guidelines for the housing and use of laboratory animals] / I.V. Belozerceva ; ed. by I.V. Belozerceva, D.V. Blinov, M.S. Krasil'shnikova. — М.: IRBIS, 2017. — 336 p. [in Russian]

9. Pozdnjakov D.I. Vlijanie soedinenij, sodержashhijh 4-gidroksi-3,5-di-tret-butylfenil'nuju gruppirovku, na aktivnost' mitohondrial'nyh fermentov i sodержanie tau-belka v gippokampe krysa na jeksperimental'noj modeli bolezni Al'cgejmera [Effect of compounds containing 4-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl grouping on mitochondrial enzyme activity and tau protein content in rat hippocampus in an experimental model of Alzheimer's disease] / D.I. Pozdnjakov, E.E. Zacepina, A.V. Arl't // Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija [Experimental and clinical pharmacology]. — 2022. — Vol. 85. — № 6. — P. 48-52. [in Russian]

10. Parfenov V.A. Profilaktika i lechenie bolezni Al'cgejmerna [Prevention and treatment of Alzheimer's disease] / V.A. Parfenov // Medicinskij sovet [Medical Council]. — 2014. — № 18. — P. 20-26. [in Russian]
11. Shelkownikova T.A. Proteinopatii - formy nejrodegenerativnyh zabolevanij, v osnove kotoryh lezhit patologicheskaja agregacija belkov [Proteinopathies are forms of neurodegenerative diseases based on abnormal aggregation of proteins] / T.A. Shelkownikova, A.A. Kulikova, F.O. Cvetkov [et al.] // Molekuljarnaja biologija [Molecular Biology]. — 2012. — № 46(3). — P. 402-415. [in Russian]
12. Shevcova E.F. Vlijanie fragmenta beta-amiloidnogo peptida 25-35 na neselektivnuju pronicaemost' mitohondrij [Effect of beta-amyloid peptide fragment 25-35 on non-selective mitochondrial permeability] / E.F. Shevcova, E.G. Kireeva, S.O. Bachurin // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. — 2001. — № 132(12). — P. 652-656. [in Russian]