(8): 25–30. Russian (Воскресенская О. Н., Клемешева Ю. Н., Акимова Т. Н. Реабилитационный потенциал инвалидов с последствиями церебрального инсульта и влияние на него факторов, характеризующих организацию реабилитационной помощи. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова 2012; 112 (8): 25–30).

10. Osos EL, Kulikova SL. Quality of life in patients with myasthenia gravis. Neurology and Neurosurgery: Eastern Europe 2012; 2 (14): 111–2. Russian (Осос Е. Л., Куликова С. Л. Качество жизни у пациентов с миастенией гравис. Неврология и нейрохирургия: Восточная Европа 2012; 2 (14): 111–2).

11. Twork S, Wiesmeth S, Klewer J, et al. Quality of life and life circumstances in German myasthenia gravis patients. Health Qual Life Outcomes 2010; 8: 129–31.

12. Utsugisawa K, Suzuki S, Nagane Y, et al. Health-related quality-of-life and treatment targets in myasthenia gravis. Muscle Nerve 2014; 50 (4): 493–500.

13. Zaslavsky LH, Khurshilov AB, Skornyakova EN. Quality of life and psycho-emotional disorders in patients with myasthenia. Clinician 2015; 9 (4): 35–8. Russian (Заславский Л. Г., Хуршилов А. Б., Скорнякова Е. Н. Качество жизни и психоэмоциональные расстройства у больных миастенией. Клиницист 2015; 9 (4): 35–8).

14. Konkova DU, Karnaukh VN. Affective disorders in myasthenia. Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics 2016; 8 (4): 21–4. Russian (Конькова Д. Ю., Карнаух В. Н. Аффективные нарушения при миастении. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика 2016; 8 (4): 21–4).

15. Romanova TV. The study of the psychological characteristics of patients with myasthenia. Doctor.ru 2013; 5 (83): 34–7. Russian (Романова ТВ. Исследование психологических особенностей больных миастенией. Доктор. ру 2013; 5 (83): 34–7).

УДК 612 Оригинальная статья

# ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ КСАНТОГУМОЛА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ИНСУЛЬТА: ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

***А. Р. Саитгареева*** *— ФГБОУ ВО «Башкирский ГМУ» Минздрава России, аспирант кафедры неврологии;* ***Л. Р. Ахмадеева*** *— ФГБОУ ВО «Башкирский ГМУ» Минздрава России, профессор кафедры неврологии, доктор медицинских наук.*

# CEREBROPROTECTIVE EFFECTS OF XANTHOHUMOL ON EXPERIMENTAL STROKE MODEL: STUDY DESIGN AND PRELIMINARY RESULTS

***A. R. Saitgareeva*** *— Bashkir State Medical University, Graduate Student of Department of Neurology;* ***L. R. Akhmadeeva*** *— Bashkir State Medical University, Professor of Department of Neurology, DSc.*

Дата поступления — 05.02.2020 г. Дата принятия в печать — 05.03.2020 г.

***Саитгареева А. Р., Ахмадеева Л. Р.*** **Церебропротекторные эффекты ксантогумола в экспериментальной модели инсульта: дизайн исследования и первые результаты. Саратовский научно-медицинский журнал 2020; 16 (1): 377–379.**

*Цель:* оценить церебропротекторный эффект ксантогумола (XN) на экспериментальных моделях острого ишемического инсульта in vivo и in vitro. *Материал и методы.* В качестве модели in vivo и in vitro используется окклюзия средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion, MCAO) и кислородно-глюкозная депривация (oxygen-glucose deprivation, OGD). Объект исследования — крысы породы Спраг-Доули, которые случайным образом разделены на три группы: группа контроля; две группы, оперированные MCAO с применением XN и без. Первичная культура кортикальных нейронов получена от новорожденных крыс. Для оценки неврологических нарушений использовались тест Бедерсона и угловой тест. *Результаты.* Предварительные результаты указывают на возможный церебропротекторный эффект XN в модели ишемического инсульта. *Заключение.* Профилактическое введение ксантогумола перед ишемизацией головного мозга в эксперименте может эффективно уменьшать объем инфаркта мозга и улучшать неврологический дефицит через 24 часа после MCAO.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, ксантогумол, экспериментальная модель.

***Saitgareeva AR, Akhmadeeva LR.*** **Cerebroprotective effects of xanthohumol on experimental stroke model: study design and preliminary results. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2020; 16 (1): 377–379.**

The *aim* of the study is to evaluate the neuroprotective effect of xanthohumol (XN) on experimental models of acute ischemic stroke in vivo and in vitro. *Material and Methods.* Middle cerebral artery occlusion (MCAO) and oxygen-glucose deprivation (OGD) are used as an in vivo and in vitro model. The object of the study is Sprag-Dawley rats, which are randomly divided into three groups: a control group; two groups operated by MCAO with and without XN. Primary culture of cortical neurons was obtained from newborn rats. We use the Bederson test and the angle test to evaluate neurological disorders. *Results.* Preliminary results indicate a possible cerebroprotective effect of XN in an ischemic stroke model. *Conclusion*. Prophylactic administration of xanthohumol before cerebral ischemia in an experiment can effectively reduce the volume of cerebral infarction and improve neurological deficiency 24 hours after MCAO.

**Key word**: Ischemic stroke, Xanthohumol, experimental research model.

**Введение.** Инсульт остается глобальной проблемой здравоохранения, особенно в неразвитых странах [1]. Клинически это вторая причина смерти [2], что делает его профилактику и лечение всемирной проблемой здравоохранения. Ишемический инсульт составляет большинство случаев, в то время как остальные случаи являются геморрагическими. Ишемический инсульт является также основной причиной инвалидности в мире [3], вследствие чего ухудшается качество жизни как больного, так и проживающих с ним родных и близких. Это делает ишемический инсульт актуальной проблемой не только медицинской, но и социально-экономической значимости.

**Ответственный автор** — Саитгареева Айгуль Рамилевна
Тел.: +7 (987) 2504888
E-mail: aneuro@yandex.ru

Ишемический каскад управляется молекулярными механизмами, которые запускают разрушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), способствуя вторичному прогрессированию травмы путем обострения отека мозга и воспалительной реакции в подострой фазе [4]. Тяжесть этих ранних событий снижает способность нейронов восстанавливаться в хронической фазе, значительно ухудшая исходы инсульта [5]. Важно отметить, что в результате ишемического инсульта возникают две основные зоны повреждения: ядро, или инфаркт, который подвергается немедленной гибели клеток в результате некроза, и периинфарктная полутень, которая подвергается замедленной запрограммированной гибели клеток [6]. Медленное прогрессирование гибели клеток в пределах полутени подразумевает, что терапевтическое спасение возможно. Однако, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в профилактике инсульта и поддерживающем лечении, пока не существует терапии, модифицирующей течение заболевания. До сих пор индуцированный тромболизис с применением рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (rt-PA) остается единственным одобренным Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов (FDA) подходом, который используется в клиниках России и мира для восстановления мозгового кровотока. Основной проблемой в терапии инсульта является поиск эффективного церебропротектора, способного спасти нейроны в потенциально спасаемой переходной зоне (полутени), которая расширяется после повреждения мозга. Следовательно, в высоком приоритете остается поиск другой терапии инсульта с хорошими эффективностью и безопасностью.

Ксантогумол (2',4',6',4-тетрагидрокси-3' — пренилхалькон) — основной пренилированный халкон (открытый с-кольцевой флавоноид) из растения хмеля. Структуру ксантогумола (XN) впервые выявил М. Верцель с соавторами в 1957 г. [7]. Однако полезные фармакологические свойства XN, включая антиоксидантную, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную, противогрибковую активность, не были полностью выяснены до 1990-х годов. [8]. В традиционной китайской медицине хмель используется для лечения бессонницы, беспокойства, диспепсии и отсутствия аппетита. Спиртовые экстракты хмеля были клинически использованы в Китае для лечения проказы, туберкулеза легких, острой бактериальной дизентерии, в противораковой терапии с положительными результатами [9]. В последнее время XN привлекает значительный интерес благодаря своей биологической активности, включая возможные церебропротекторные свойства [10].

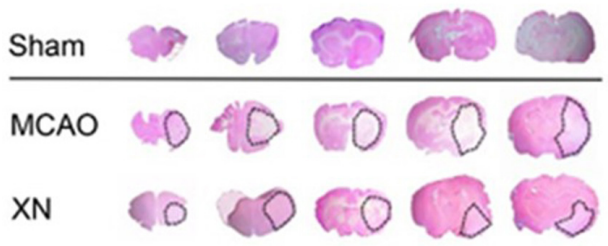
*Цель:* оценка церебропротекторного эффекта ксантогумола на экспериментальных моделях острого ишемического инсульта in vivo и in vitro.

**Материал и методы.** В исследование включены in vivo 36 самцов крыс породы Спраг-Доули (масса тела 250–280 г). Все эксперименты проведены в соответствии с Методическими рекомендациями по уходу и использованию животных в национальных институтах здоровья при использовании лабораторных животных. Животные случайным образом разделены на три группы: группу контроля (n=12), которой производились хирургические вмешательства по схеме MCAO, но без окклюзии сосуда; две группы, оперированные MCAO (n=24), одной из которых (n=12) вводилось внутрибрюшинно 0,4 мг/кг ксантогумола за 10 минут до окклюзии средней мозговой артерии. Крысы в группе контроля и группе MCAO получали физиологический раствор в качестве плацебо. Для анестезии животным интраперитонеально вводился хлоралгидрат (350 мг/кг массы тела). Обе группы MCAO подвержены операции окклюзии средней мозговой артерии [11]. Через 60 минут монофиламент мягко удалялся, и крысы реперфузировались в течение 24 часов. Крысы в группе контроля тоже оперировались в рамках экспериментальной модели MCAO, но без введения монофиламента. Животные обследовались на неврологический дефицит с использованием шкалы Бедерсона и углового теста [12]. Оценку по данным тестам производили до окклюзии средней мозговой артерии и через 24 часа после. Для углового теста подготовлен угол в 30 градусов, а затем крысам разрешали войти в угол. Зафиксировано направление крыс, повернутых под углом. У ишемизированных животных развивалось игнорирование половины пространства (неглект), поэтому они поворачивают преимущественно в здоровую сторону. Считалось число поворотов в каждую сторону в 10 попытках. Тест Бедерсона проводился трижды, учитывался неврологический дефицит более 2 баллов по данному тесту. Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Первичная культура нейронов для фрагмента in vitro нашего исследования получена от новорожденных крыс. Клетки суспендировали в среде на основе нервов, содержащей 2% B27 и 10% фетальной бычьей сыворотки, и укладывали на культуральную чашку, покрытую полилизином, затем помещали в инкубатор, содержащий 5% углекислого газа при 37°C. Смена среды происходила каждые три дня [13]. Культуры нейронов случайным образом разделены на контрольную группу, группу кислородно-глюкозной депривации с XN и без.

Для измерения объема инфаркта в модели in vivo проводились следующие шаги: после 24-часовой реперфузии крыс забивали, затем мозг перфузировали холодным PBS (фосфатный буферный физиологический раствор, pH 7,4), а затем перфузировали холодным 4%-м полиформальдегидом (PFA). Ткани мозга погружали в сахарозу и разрезали на замороженные коронарные срезы толщиной 20 мкм. Для определения объема церебрального инфаркта срезы головного мозга окрашивали гематоксилином и эозином (HE) и наблюдали под оптическим микроскопом. Для наблюдения за количеством и морфологией нейронов проводили окрашивание по Нисслю. Замороженные срезы мозга окрашивались раствором Ниссля, затем обесцвечивали спиртом и погружали в ксилол в соответствии с инструкциями производителя. Наблюдение велось с помощью оптической микроскопии.

**Результаты.** Группа крыс, получившая ксантогумол, показала значимо лучшие результаты по тесту Бедерсона и угловому тесту через 24 часа после инсульта при сравнении с группой MCAO без ксантогумола. Разница показателей неврологического дефицита между группами составила 1 балл, по оценке теста Бедерсона. Применение уголового теста у ишемизированных крыс в группах MCAO и XN позволил выявить, что у крыс развивался двигательный неглект правой половины пространства, поэтому такие крысы в угловом тесте поворачивались преимущественно в левую сторону. Кроме того, обнаружено, что крысы, получившие XN, имеют несколько более высокую выживаемость, чем крысы в группе без лечения: выживаемость в группе XN составила 92%, в группе MCAO 70%. При окрашивании церебраль-




Объем церебрального инфаркта в эксперименте. Окрашивание гематоксилином и эозином: Sham — группа контроля; MCAO — группа крыс с окклюзией средней мозговой артерии; XN — группа крыс с окклюзией средней мозговой артерии и применением ксантогумола

ных структур post mortem гематоксилином и эозином для определения объема инфаркта наиболее массивный инфаркт головного мозга наблюдается в группе MCAO, не получившей XN (рисунок).

Объем же инфаркта головного мозга значительно уменьшен, когда крысам перед операцией MCAO вводится ксантогумол. Эти данные свидетельствуют о том, что предварительная обработка ксантогумолом оказывает церебропротекторное действие.

Проводили окрашивание по Нисслю для наблюдения за изменением морфологии ишемизированных нейронов. Нейроны в контрольной группе не подвергались ишемии. Нейроны становятся темными и треугольной формы в группе MCAO без XN, что свидетельствует о повреждении нейронов. Морфология нейронов в группе XN больше похожа на форму нейронов, которая наблюдается в контрольной группе. Затем проводится проточная цитометрия для оценки влияния ксантогумола на жизнеспособность нейронов. Анализ жизнеспособности клеток с помощью CCK-8 показывает, что жизнеспособность нейронов значительно снижена после кислородно-глюкозной депривации. Введение ксантогумола увеличивает жизнеспособность, а также выживаемость нейронов после кислородно-глюкозной депривации. Кроме того, скорость апоптоза нейронов, индуцированная кислородно-глюкозной депривацией, значительно увеличена по сравнению с контрольной группой, в то время как скорость апоптоза нейронов в группе ксантогумола значительно ниже.

**Обсуждение.** Животные модели очаговой церебральной ишемии, для которой обычно используется MCAO, воспроизводят картину ишемического повреждения мозга, наблюдаемую у многих пациентов с ишемическим инсультом человека [14]. В ишемизированных клетках мозга гибель нейронов необратима [15]. Рассматривается возможная эффективность различных вмешательств перед возникновением церебрального инфаркта, что может обеспечить пациентов преимуществом благоприятного исхода при церебральной ишемии. Ксантогумол обладает многими фармакологическими эффектами и рассматривается как потенциальное природное полезное вещество. Хотя было показано, что ксантогумол обладает церебропротекторным потенциалом, положительные эффекты ксантогумола на церебральную ишемию и инсульт остаются неясными [16] и требуют более детального изучения. Планируется также проведение вестерн-блоттинга для определения количественного уровня экспрессии белка гомогенатов мозговой ткани и первичных нейронов.

**Заключение.** На этапе промежуточных результатов нами обнаружено, что профилактическое введение ксантогумола перед ишемизацией головного мозга в эксперименте может эффективно уменьшать объем инфаркта мозга и улучшать неврологический дефицит через 24 часа после MCAO. Кроме того, применение ксантогумола увеличивает жизнеспособность животных в эксперименте и выживаемость нейронов после кислородно-глюкозной депривации. В дальнейшем мы планируем продолжить данное исследования для получения и оценки наших результатов для подтверждения церебропротекторного эффекта ксантогумола.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена на средства Башкирского государственного медицинского университета и Харбинского медицинского университета (Китай).

## References (Литература)

1. O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, et al. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. Lancet 2016; (388): 761–75.

2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 2012; (380): 2095–128.

3. Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. Stroke 2015; (46): e121–2.

4. Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science 2010; (327): 656–61.

5. Elali A. The implication of neurovascular unit signaling in controlling the subtle balance between injury and repair following ischemic stroke. Neural Regen Res 2016; (11): 914–5.

6. Lo EH. A new penumbra: Transitioning from injury into repair after stroke. Nat Med 2008; (14): 497–500.

7. Verzele M, Stockx J, Fontijn F, Anteunis M. Xanthohumol, a new natural chalkone. J Agric Food Chem 1957; (66): 452–75.

8. Liu M, Hansen PE, Wang G, et al. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (Humulus lupulus). Molecules 2015; (20): 754–79.

9. Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. J Ethnopharmacol 2008; (116): 383–96.

10. Xuan NT, Shumilina E, Gulbins EGu, et al. Triggering of dendritic cell apoptosis by xanthohumol. Mol Nutr Food Res 2010; 54 (Suppl. 2): 214–24.

11. Chen B, Zhang F, Li QY et al Protective Effect of Ad-VEGF-Bone Mesenchymal Stem Cells on Cerebral Infarction. Turk Neurosurg 2016; (26): 8–15.

12. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke 1986; (17): 472–6.

13. Qu Y, Mao M, Zhao F, et al. Proapoptotic role of human growth and transformation-dependent protein in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. Stroke 2009; (40): 2843–8.

14. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. Stroke 1989, (20): 1627–42.

15. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nat Med 2011; (17): 796–808.

16. Li F, Yao Y, Huang H, et al. Xanthohumol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibiting NF-κB and activating $Nrf^2$ signaling pathways. Int Immunopharmacol 2018; (61): 277–82.