

2

2016

MEDICINE  
ISSN 2074-5982

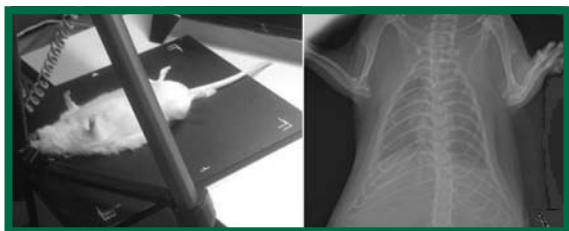
2016

2

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

## Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола

И.А. Титович, В.Ц. Болотова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург

Контактная информация: к.ф.н. Болотова Вера Цезаревна, vera.bolotova@pharminnotech.com

Изучена антигипоксическая активность нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) на моделях острой нормобарической, гемической и гипоксической гипоксии. Антигипоксический эффект ФДЭС (доза 75 мг/кг) превосходил активность цитофлавина (дозы 75 и 600 мг/кг) и был сопоставим с действием амтизола (доза 50 мг/кг).

**Ключевые слова:** острая нормобарическая гипоксия, острая гемическая гипоксия, острая гипоксическая гипоксия, гипоксикамера, цитофлавин, амтизол.

### Введение

Гипоксия является сложным функционально-метаболическим нарушением, в основе которого лежит снижение доставки и утилизации кислорода в клетках организма, что может быть обусловлено нарушением функционирования дыхательной и сердечно-сосудистой систем, транспорта крови, митохондриальной дисфункцией [5]. К настоящему времени проведено множество исследований по экспериментальному и клиническому изучению препаратов с потенциальным антигипоксическим действием среди разных классов химических соединений природного и синтетического происхождения.

В медицинской практике широкое применение при различных гипоксических состояниях нашли антигипоксанты, которые способны поддерживать при гипоксии активность сукцинатоксидазного звена. Это FAD-зависимое звено цикла Кребса, позднее угнетающееся при гипоксии по сравнению с NAD-зависи-

мыми оксидазами, может определенное время поддерживать энергопродукцию в клетке при условии наличия в митохондриях субстрата окисления в данном звене – сукцината (янтарной кислоты) [10]. В последние годы установлено, что янтарная кислота реализует свои эффекты не только как интермедиат различных биохимических циклов, но и как лиганд специфических рецепторов (SUCNR1, GPR91), расположенных на цитоплазматической мембране клеток и сопряженных с G-белками [7, 15].

**Целью** исследования явилось изучение влияния нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) на устойчивость организма лабораторных животных к гипоксии.

### Материалы и методы

**Регулирующие стандарты.** Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Россий-

ской Федерации [11], в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [14], согласно утвержденному письменному протоколу. Также исследования проводили в соответствии с СОП организации, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

**Тестируемые животные.** Исследования выполнены на 312-ти белых беспородных мышах-самцах массой 17-25 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные были рандомизированы по группам в соответствии с задачами эксперимента. Опытная группа включала 8 особей, контрольная – 16. Опытные и контрольные группы мышей были уравнены по массе, условиям кормления и содержания.

**Условия кормления и содержания.** Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все животные опытной и контрольной групп были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14-ти суток.

**Объект исследования.** В качестве объекта исследования было выбрано соединение аминоэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами (ФДЭС) в дозах 10, 25, 50 и 75 мг/кг.

Новое соединение синтезировано на кафедре органической химии СПХФА. В основе фармакологической концепции, реализованной при создании этой субстанции с антигипоксическим эффектом, лежит ее предполагаемая

направленность действия на энерго-продуцирующие системы нейронов и периферических тканей, как наиболее страдающие при гипоксии различного генеза. Ранее для соединений со сходным химическим строением была показана способность увеличивать количество и активность митохондрий, что может объяснять возможное антигипоксическое действие [1-3].

В качестве референсных средств применяли сукцинатсодержащий антигипоксикант цитофлавин (ООО «НТФФ Полисан», Россия) в дозах 10, 25, 50, 75 и 600 мг/кг (по янтарной кислоте), который хорошо изучен в качестве антигипоксического средства, и эталонный антигипоксикант поливалентного действия амтизол в дозах 25 и 50 мг/кг [4]. Препараты вводили перорально однократно за 1 ч до начала эксперимента. Животные контрольной группы получали очищенную воду в эквивалентных количествах.

Антигипоксическую активность препаратов изучали на трех моделях гипоксии: острой нормобарической (ОНГ), острой гемической (ОГемГ) и острой гистотоксической гипоксии (ОГтГ) [4].

**Модель острой нормобарической гипоксии.** Исследования проводили в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» (горный воздух) (ООО «НТО Био-Нова», Россия). Окружающий воздух, очищенный фильтром, сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. Полупроницаемые мембраны обладают свойством селективного пропускания молекул кислорода и азота воздуха. На выходе мембранного модуля получается воздух с уменьшенным содержанием кислорода. С выхода газоразделительного блока газ поступает по шлангу в камеру

(объем 75 л) нормобарической гипоксии. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС – не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроен в установку. В работе использована проба нарастающей гипоксии, в ходе которой на приборе выставлялось минимальное содержание кислорода в газовой смеси (3%), и животные подвергались гипоксическому воздействию в ходе вывода прибора на максимальный уровень гипоксии. В гипоксическую камеру помещали до 30-ти мышей одновременно контрольной и опытной групп. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в ГГС, который вызывал его гибель.

Стандартизированные условия эксперимента в гипоксикамере представлены на рис.

Установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4%.

**Модель острой гемической гипоксии.** Для создания модели ОГемГ животным вводили внутрибрюшинно натрия нитрит (300 мг/кг), предварительно растворив его в воде очищенной. Учитывали продолжительность жизни мышей в мин [4].

**Модель острой гистотоксической гипоксии.** Моделировали ОГтГ путем внутрибрюшинного введения мышам 0,4% водного раствора натрия нитропруссиды (20 мг/кг). Регистрировали продолжительность жизни животных после введения ингибитора тканевого дыхания [4].

**Статистическая обработка** данных проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа и методов вариационной статистики.

### Результаты и их обсуждение

На модели ОНГ было установлено, что животные, которым вводили ФДЭС в дозе 75 мг/кг, погибали при вдыхании воздушной смеси, содержащей на 16 и 11% кислорода меньше по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,005$ ) и цитофлавина 600 мг/кг ( $p < 0,05$ ) соответственно, также эта группа была сопоставимо

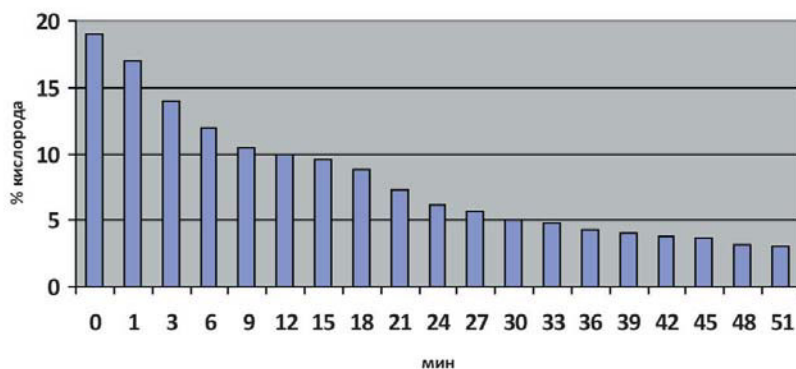


Рис. Динамика процентного содержания кислорода в гипоксической газовой смеси при выполнении гипоксической пробы.

с группой амтизола 25 мг/кг ( $p < 0,05$ ). По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: амтизол 50 мг/кг > ФДЭС 75 мг/кг = амтизол 25 мг/кг > цитофлавин 600 мг/кг. Результаты исследований представлены в таблице.

На модели ОГемГ ФДЭС (доза 75 мг/кг), цитофлавин (доза 75 мг/кг) и амтизол (доза 50 мг/кг) оказали наиболее выраженный антигипоксический эффект (табл.). У животных, которым вводили ФДЭС (доза 75 мг/кг), эффект превосходил группы цитофлавина (доза 75 мг/кг), амтизола (доза 50 мг/кг) и

Таблица  
Влияние ФДЭС на переносимость животными различных видов гипоксии

Группа животных	Кол-во животных в группе	Острая гипоксическая гипоксия	Острая гемическая гипоксия	Острая гистотоксическая гипоксия
		Уровень кислорода во вдыхаемом воздухе, %	Время жизни, мин	Время жизни, мин
Контроль	16	4,21±0,18	15,47±1,95	9,74±1,59
Цитофлавин, 10 мг/кг	8	4,60±0,08 <sup>1,3,8</sup>	13,68±0,62 <sup>10,12</sup>	8,37±0,21 <sup>3,6</sup>
Цитофлавин, 25 мг/кг	8	4,54±0,14 <sup>1,7</sup>	14,63±0,63 <sup>10,12</sup>	10,27±0,80 <sup>6</sup>
Цитофлавин, 50 мг/кг	8	4,14±0,13 <sup>6,11,12</sup>	14,26±1,17 <sup>10,12</sup>	7,32±0,66 <sup>1,3,7,12</sup>
Цитофлавин, 75 мг/кг	8	4,76±0,08 <sup>2,3</sup>	17,51±1,18 <sup>2,9,12</sup>	10,37±0,99 <sup>1,3,12</sup>
Цитофлавин, 600 мг/кг	8	4,05±0,18 <sup>9</sup>	15,60±4,16	20,70±6,35 <sup>1</sup>
Амтизол, 25 мг/кг	8	3,61±0,14 <sup>2,9</sup>	16,90±1,71 <sup>9,12</sup>	15,14±1,61
Амтизол, 50 мг/кг	8	3,35±0,07 <sup>3,4,6</sup>	23,00±1,53 <sup>2,3,6,12</sup>	16,84±0,67 <sup>1,3,12</sup>
ФДЭС, 10 мг/кг	8	3,72±0,08 <sup>1,9</sup>	15,13±1,70 <sup>10,12</sup>	14,61±1,20 <sup>1,3,9</sup>
ФДЭС, 25 мг/кг	8	3,86±0,14 <sup>9</sup>	16,88±2,22 <sup>9,12</sup>	14,12±2,09 <sup>12</sup>
ФДЭС, 50 мг/кг	8	4,02±0,07 <sup>11,12</sup>	20,02±3,02	17,84±1,97 <sup>2</sup>
ФДЭС, 75 мг/кг	8	3,62±0,07 <sup>2,9</sup>	27,27±3,25 <sup>2,3,6,9</sup>	16,97±3,09 <sup>2,3,9</sup>

Примечание: 1 – достоверное отличие от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); 2 – достоверное отличие от контрольной группы ( $p < 0,005$ ); 3 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ( $p < 0,05$ ); 4 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ( $p < 0,005$ ); 5 – достоверное отличие от группы цитофлавина 600 мг/кг ( $p < 0,0005$ ); 6 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ( $p < 0,05$ ); 7 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ( $p < 0,005$ ); 8 – достоверное отличие от группы амтизола 25 мг/кг ( $p < 0,0005$ ); 9 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ( $p < 0,05$ ); 10 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ( $p < 0,005$ ); 11 – достоверное отличие от группы амтизола 50 мг/кг ( $p < 0,0005$ ); 12 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ( $p < 0,05$ ); 13 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ( $p < 0,005$ ); 14 – достоверное отличие от группы ФДЭС 75 мг/кг ( $p < 0,0005$ ).

контрольную группу мышей на 55%, 18% ( $p < 0,05$ ) и 76% ( $p < 0,005$ ) соответственно. По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: ФДЭС 75 мг/кг > амтизол 50 мг/кг > ФДЭС 50 мг/кг > цитофлавин 75 мг/кг.

На модели ОГТГ установлено, что введение ФДЭС (дозы 50 и 75 мг/кг) способствовало выраженному увеличению продолжительности жизни мышей на 83,2 и 74,2% соответственно по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,005$ ), эффект был сопоставим с амтизолом (доза 50 мг/кг) ( $p < 0,05$ ), однако уступал цитофлавинову (доза 600 мг/кг) ( $p < 0,05$ ). По убыванию антигипоксической активности препараты можно расположить в следующей последовательности: цитофлавин 600 мг/кг > ФДЭС 50 мг/кг > ФДЭС 75 мг/кг = амтизол 50 мг/кг > амтизол 25 мг/кг.

Известно, что метаболическая энергокоррекция и антигипоксическая активность цитофлавина обусловлена взаимодействующим действием янтарной кислоты, инозина, никотинамида и рибофлавина. Янтарная кислота не только является субстратным антигипоксантом – интермедиатом цикла трикарбоновых кислот, но и активирует специфические рецепторы (SUCNR1), сопряженные с G-белками, запуская каскад внутриклеточных адаптационных изменений. Рибофлавин за счет своих коферментных свойств увеличивает активность сукцинатдегидрогеназы и оказывает не прямое антиоксидантное действие (за счет восстановления окисленного глутатиона). Предполагается, что входящий в состав никотинамид активирует NAD-зависимые ферменты

системы, однако этот эффект менее выражен, чем у NAD. За счет инозина достигается увеличение содержания общего пула пуриновых нуклеотидов, необходимых не только для ресинтеза макроэргов (АТФ и ГТФ), но и вторичных мессенджеров (цАМФ и цГМФ), а также нуклеиновых кислот. Определенную роль может играть способность инозина несколько подавлять активность ксантиноксидазы, уменьшая тем самым продукцию высокоактивных форм и соединений кислорода [1, 7, 8, 10].

Полученные в исследовании данные по фармакологической активности цитофлавина на различных моделях гипоксии подтвердили ранее проведенные исследования по изучению антигипоксической активности раствора цитофлавина. Так, внутрибрюшинное введение препарата мышам в дозе 1 мл/кг показало его антигипоксическое действие только в баро- и гермокамере у мышей, в то время как на моделях острой гемической и гистотоксической гипоксии оно было незначительным [13]. Очевидно, на этих, наиболее «жестких» моделях гипоксии, действие сукцината как интермедиата цикла трикарбоновых кислот не успевает развиваться из-за подавления и ФАД-зависимых ферментов в условиях очень жесткого дефицита кислорода или блокады электрон-транспортной цепи.

Амтизол активно проникает в митохондрии, уменьшает угнетение дегидрогеназ цикла Кребса, предотвращает разобщение окисления и фосфорилирования, увеличивает продукцию АТФ. Кроме того, препарат снижает кислородный запрос тканей за счет ингибирования митохондриального и свободно-

радикального окисления и увеличивает использование кислорода в энергопродуцирующих окислительных реакциях в митохондриях. Амтизол активирует гликолиз с увеличением анаэробного образования АТФ, уменьшает образование лактата и увеличивает его утилизацию в реакциях глюконеогенеза, обеспечивает ресинтез углеводов, ослабляя проявления метаболического ацидоза [1, 6].

Новое фармакологическое средство состоит из этилового производного аминокэтанола, к которому присоединены молекулы бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновой кислот. Аминокэтанола, являясь прекурсором холина, обеспечивает синтез ацетилхолина и фосфатидилхолина нейрональных мембран и повышает биодоступность кислот в клетку [3].

Бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновые кислоты реализуют свои эффекты через специфические орфаные рецепторы (SUCNR1, HCA2) на глиальных клетках, а также повышают устойчивость нейронов к гипоксии через метаболические пути – в первую очередь, энергопродуцирующие. Кроме того, бутандиовая и транс-этилен-1,2-дикарбоновые кислоты способствуют восполнению фонда сукцината и фумарата соответственно в цикле Кребса и увеличению образования АТФ в клетках. Однако в условиях «жесткой» гипоксии дефицит кислорода, лимитирующий скорость окисления всех субстратов, снижает ценность сукцината. В этих условиях инверсивные превращения фумарата выполняют роль триггера, который, в зависимости от концентрации кислорода, регулирует течение

конечных реакций цикла Кребса в прямом «сукцинат-фумарат-малат» либо в обратном «малат-фумарат-сукцинат» направлениях, и сопровождаются синтезом АТФ. При дефиците кислорода фумарат, восстанавливаясь ФАД·Н<sub>2</sub>-группой сукцинатдегидрогеназы, превращается в сукцинат и освобождает новые порции окисленной формы ФАД. Принимая восстановительные эквиваленты от НАД-Н, ФАД способствует снятию гипертонности НАД-звена дыхательной цепи и синтезу АТФ в бескислородной среде. К тому же, образование в этих реакциях окисленной формы НАД запускает также и механизм гликолитической продукции АТФ [9].

В реализации антигипоксической активности нового соединения аминокэтанола существенную и достоверную роль играют как анионная часть (кислотный остаток), так и эфирное производное аминокэтанола и дикарбоновые кислоты, что было показано ранее для соединений сходной структуры [12].

### Выводы

1. Установлена эффективная антигипоксическая доза нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и транс-этилен-1,2-дикарбоновыми кислотами, которая при пероральном однократном введении составляет 75 мг/кг.

2. По своему антигипоксическому действию новое производное аминокэтанола с дикарбоновыми кислотами (доза 75 мг/кг) на моделях острой гипоксической, гемической и гистотоксической гипоксии превосходит референсный препарат цитофлавин (доза 600 мг/кг) и сопоставимо с эффектом амтизола (доза 50 мг/кг).

### Список литературы

1. *Афанасьев В.В., Лукьянова И.Ю.* Особенности применения цитофлавина в современной клинической практике. – СПб. 2010. 80 с.
2. *Гайворонская В.В., Оковитый С.В., Колышев И.Ю., Шустов Е.Б., Болотова В.Ц.* Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации после частичной гепатэктомии // Биомедицина. 2013. № 1. С. 16-21.
3. *Каркищенко В.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н. Шустов Е.Б., Котенко К.В., Оковитый С.В.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 2. Векторы фармакопротекции / Под ред. Н.Н. Каркищенко, В.В. Уйба. - СПб: Изд-во Айсинг. 2014. 448 с.
4. *Лукьянова Л.Д.* Методические рекомендации к экспериментальному изучению препаратов, предназначенных для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. - М., Б.и. 1990. 18 с.
5. *Лукьянова Л.Д.* Современные представления о биоэнергетических механизмах адаптации к гипоксии // Нур. Med. J. 2002. Т. 10. № 3-4. С.30-43.
6. *Оковитый С.В.* Клиническая фармакология антигипоксантов. Ч. 1. Вып. 6. 2004. «ФАРМ-индекс-Практик». С. 30-39.
7. *Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б.* Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 9. С. 24-28.
8. *Саватеева-Любимова Т.Н., Лесиовская Е.Е., Сивак К.В.* Гемато-, нефро- и гепатопротективные эффекты цитофлавина и настойки семян лимонника при интоксикации аминокэтанола // Медицина экстремальных ситуаций. 2008. № 3(25). С.68-75.
9. *Слепнева Л.В., Хмылова Г.А.* Механизм повреждения энергетического обмена при гипоксии и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами // Трансфузиология. 2013. Т. 14. № 2. С. 49-65.
10. *Суханов Д.С., Запутанов В.А., Смагина А.Н.* Антигипоксанты в современной клинической практике // Клиническая медицина. 2012. № 9. С. 63-68.
11. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
12. *Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Оковитый С.В., Болотова В.Ц., Юсковец В.Н.* Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием // Биомедицина. 2015. № 1. С. 18-23.
13. *Яснецов В.В., Просвирова Е.П., Цублова Е.Г., Яснецов Вик.В., Мотин В.Г., Карсанова С.К.* Сравнительное исследование противогипоксического, нейропротекторного и обезболивающего действия сукцинатсодержащих препаратов // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2012. Т. 46. № 6. С. 41-45.
14. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg, 1986.
15. *Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., et al.* G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery // Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 2014. Vol. 34. No. 2. P. 285-293.

## Experimental study of antihypoxic activity of a new derivative aminoethanol

I.A. Titovich, V.Ts. Bolotova

Antihypoxic activity was studied of new compounds of aminoethanol with butanediol and trans-ethylene-1,2-dicarboxylic acids (FDES) on the model of acute normobaric, hemic and histotoxic hypoxia. Antihypoxic effect FDES (dose 50 mg/kg and 75 mg/kg) was superior to the effect of citoflavin (dose 75 mg/kg and 600 mg/kg) and was comparable the effect of amtizol (dose 50 mg/kg).

**Key words:** acute normobaric hypoxia, acute hemic hypoxia, acute histotoxic hypoxia, hypoxic chamber, cytoflavin, amtizol.