

# Экспериментальная и клиническая ФАРМАКОЛОГИЯ



**5**  

---

2017



**ФОЛИУМ**  
ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АМИНОЭТАНОЛА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

И. А. Титович, Ю. И. Сысоев, В. Ц. Болотова, С. В. Оковитый<sup>1</sup>

Изучена нейротропная активность нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и *транс*-этилен-1,2-дикарбоновой кислотами — (2E)-4-[2-(диэтиламино)этокси]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоата (2:1) — при курсовом пероральном введении (10 мг/кг) на фоне ишемии головного мозга, вызванной двусторонней перманентной перевязкой общих сонных артерий у крыс. У животных оценивали ориентировочно-исследовательское поведение и координацию движений. По активности производное аминокэтанола сопоставимо с действием цитиколина (500 мг/кг) и цитофлавина (170 мг/кг).

**Ключевые слова:** ишемический инсульт; ротарод; открытое поле; ФДЭС; цитиколин; цитофлавин; деанола ацеглумат; крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Инсульт или церебральная ишемия — это состояние недостаточного кровоснабжения головного мозга, сопровождающееся стремительной гибелью его клеток [10]. Инсульт является одной из лидирующих причин заболеваемости и смертности в мире, уступая только ишемической болезни сердца и онкологическим заболеваниям [5]. Также инсульт — вторая по частоте причина смерти больных старше 60 лет и пятая — людей в возрасте 15–29 лет [6]. Церебральная ишемия приводит к длительной нетрудоспособности и большим экономическим потерям. Перенесенный инсульт часто осложняется деменцией, депрессией, а в некоторых случаях и эпилепсией [8, 9]. В Российской Федерации, как и в большинстве стран мира, преобладают ишемические инсульты, составляющие до 80 % от общего числа острых нарушений мозгового кровообращения [2].

Существуют 2 подхода к лечению инсульта и его последствий. Первый — восстановление тока крови по сосудистым магистралям посредством тромболитической терапии или хирургически в течение первых нескольких часов с начала возникновения инсульта. Второй подразумевает фармакологическую нейропротекцию, однако на сегодняшний день безусловно эффективной нейропротекторной программы, продемонстрировавшей достоверное улучшение исхода заболевания, не существует.

Целью исследования явилось изучение нейропротекторной активности нового соединения аминокэтанола с бутандиовой и *транс*-этилен-1,2-дикарбоновой

кислотами (ФДЭС) на модели ишемии головного мозга, вызванной двусторонней перманентной перевязкой общих сонных артерий у крыс.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказ Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», согласно утвержденному письменному протоколу. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 сут.

Исследования выполнены на 84 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Лабораторные животные рандомизированы по группам в соответствии с задачами эксперимента на основании тестов «открытое поле» и «ротарод». Опытные, контрольные и ложнооперированные группы животных включали 12 особей, уравненных по массе, поведению, условиям кормления и содержанию.

Церебральную ишемию моделировали двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (350 мг/кг, Sigma, США). Посредством хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них полипропиленовые лигатуры и перевязывали. У ложнооперированных крыс выполняли те же манипуляции, кроме перевязки общих сонных артерий.

ФДЭС применяли в дозах 10 и 75 мг/кг. В качестве референсных препаратов использовали средства, традиционно используемые в терапии нарушений мозго-

<sup>1</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Таблица 1. Влияние исследуемых препаратов на летальность крыс после двусторонней необратимой перевязки обеих общих сонных артерий

| Группа            | Время регистрации летальных исходов от момента операции |       |       |                    |       |                    |        |       |        |                    |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-------|-------|--------------------|-------|--------------------|--------|-------|--------|--------------------|
|                   | 1 сут                                                   |       | 3 сут |                    | 7 сут |                    | 14 сут |       | 21 сут |                    |
|                   | n/N                                                     | %     | n/N   | %                  | n/N   | %                  | n/N    | %     | n/N    | %                  |
| ЛО                | 12/12                                                   | 100   | 12/12 | 100                | 12/12 | 100                | 12/12  | 100   | 12/12  | 100                |
| Контроль          | 6/12                                                    | 50    | 5/12  | 41,67              | 4/12  | 33,33              | 4/12   | 33,33 | 4/12   | 33,33              |
| ФДЭС, 10 мг/кг    | 8/12                                                    | 66,67 | 7/12  | 58,33 <sup>1</sup> | 7/12  | 58,33 <sup>1</sup> | 7/12   | 58,33 | 7/12   | 58,33 <sup>1</sup> |
| ФДЭС, 75 мг/кг    | 8/12                                                    | 66,67 | 8/12  | 66,67 <sup>1</sup> | 8/12  | 66,67 <sup>1</sup> | 8/12   | 66,67 | 8/12   | 66,67 <sup>1</sup> |
| Цитиколин         | 7/12                                                    | 58,33 | 7/12  | 58,33              | 6/12  | 50                 | 6/12   | 50    | 6/12   | 50                 |
| Цитофлавин        | 6/12                                                    | 50    | 5/12  | 41,67              | 3/12  | 25                 | 3/12   | 25    | 3/12   | 25                 |
| Деанола ацеглумат | 7/12                                                    | 58,33 | 6/12  | 50                 | 6/12  | 50                 | 6/12   | 50    | 6/12   | 50                 |

Примечание: N — количество животных в группе; n — количество выживших животных в группе; ЛО — ложнооперированные животные; <sup>1</sup> — достоверные отличия от контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

вого кровообращения — цитофлавин (ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Россия) в дозе 170 мг/кг по янтарной кислоте, цитиколин (Феррер Интернасьональ, С. А., Испания) в дозе 500 мг/кг и деанола ацеглумат (ООО “ПИК-ФАРМА”, Россия) в дозе 75 мг/кг. Препараты вводили перорально за 30 мин до операции и далее каждый день в течение 21 дня. Животные контрольной и ложнооперированной группы получали физиологический раствор в эквивалентных количествах.

На 21 сут оценивали выживаемость животных, ориентировочно-исследовательское поведение и выраженность неврологического дефицита. Ориентировочно-исследовательское поведение изучали в тесте “открытое поле” (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) за день до введения животных в эксперимент и по его окончанию. Для этого каждое животное по одному помещали в центр поля и включали секундомер на 3 мин. Фиксировали количество пересечений, стоек, заглядываний в норки, дефекаций, уринаций и груминга. По истечении времени проверяли реакцию на хлопок и захват, результат выражали в баллах. Оценивали общую двигательную активность (ОДА), складывающуюся из горизонтальных и вертикальных перемещений, груминга и заглядываний в норки; поисково-исследовательскую активность (ПИА) определяли как сумму вертикальных перемещений и заглядыва-

ний; эмоциональную лабильность (ЭЛ) — как сумму дефекаций и уринаций; агрессивность (Аг) — как сумму баллов за реакцию на хлопок и захват [7].

Для определения степени неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений, крыс помещали в аппаратно-программный комплекс “Ротарод” (АПК “Ротарод”) (ООО “Нейроботикс”, Россия) с постепенно увеличивающейся скоростью вращения стержня от 4 до 30 об/мин в течение 5 мин. Регистрировали время удержания животного на вращающемся стержне.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ “Statistica 6.0”. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием *W*-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью *t*-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (для сравнения 2 попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводи-

Таблица 2. Влияние исследуемых препаратов на координацию движений ( $M \pm SD$ )

| Группа            | Время удержания на вращающемся стержне, с |                               |
|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
|                   | исходный уровень                          | итоговый уровень              |
| Интактные         | 218,22 ± 17,17                            | 197,28 ± 20,3 <sup>1</sup>    |
| Контрольная       | 202,41 ± 5,82                             | 48,24 ± 9,10 <sup>1</sup>     |
| ФДЭС 10 мг/кг     | 207,22 ± 22,94                            | 138,20 ± 33,83 <sup>1,2</sup> |
| ФДЭС 75 мг/кг     | 218,90 ± 15,46                            | 143,58 ± 24,35 <sup>1,2</sup> |
| Деанола ацеглумат | 211,61 ± 15,47                            | 60,58 ± 22,75 <sup>1</sup>    |
| Цитиколин         | 195,31 ± 9,38                             | 106,21 ± 24,85 <sup>1,2</sup> |
| Цитофлавин        | 195,95 ± 13,45                            | 59,55 ± 17,25 <sup>1</sup>    |

<sup>1</sup> Достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> — достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

мые в табл. 1 – 3, представлены в виде: средняя арифметическая ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ). Уровень доверительной вероятности задан равным 95 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что перманентная перевязка общих сонных артерий вызывает гибель животных, наиболее часто в первые сутки после операции и отмеченную до 72 ч. К 21 сут в живых осталось 33,3 % контрольных крыс (табл. 1).

Введение исследуемых препаратов позволило снизить летальность животных после операции. Наибольший эффект оказал ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг, к концу эксперимента количество выживших крыс было достоверно больше в 1,8 и 2 раза, соответственно, по сравнению с группой контрольных животных.

В группах цитиколина и деанола ацеглумата выживаемость была одинаковой и составила 50 %. В эксперименте, проведенном на модели фокальной ишемии [11], смертность в группе цитиколина составляла 41,7 % на 4 сут после операции, что сопоставимо с результатами нашего исследования. Также в ранее проведенных исследованиях зафиксировано увеличение выживаемости животных после введения деанола ацеглумата в дозах 1, 10, 20, 50 и 100 мг/кг при билатеральной окклюзии сонных артерий, причем наиболее эффективным препарат оказался в дозах 10, 20 и 50 мг/кг, в которых он увеличивал выживаемость с 20 % в контроле до 80, 70 и 60 % в опыте соответственно [3].

В проведенном исследовании не удалось выявить влияния цитофлавина в дозе 170 мг/кг на летальность животных после перманентной перевязки обеих сонных артерий. Однако в другом исследовании с исполь-

зованием препарата в дозах 175 мг/кг наблюдали снижение смертности на 54,8 % [1]. Такие различия в летальности, очевидно, могут быть обусловлены тем, что авторами использована неполная перевязка общих сонных артерий.

Ишемическое повреждение головного мозга приводило к развитию неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений. Так, в контрольной группе крыс время удержания на выражающемся стержне достоверно снизилось в 4,2 раза, по сравнению с исходными значениями, в то время как в группах ФДЭС в обеих дозах этот показатель снизился в 1,5 раза, достоверно отличаясь от значений контрольной группы (табл. 2).

У крыс, которым вводили другие препараты, наилучший результат продемонстрировал цитиколин, на фоне которого время удержания на стержне снизилось в 1,8 раза по сравнению с исходным уровнем. Ранее способность цитиколина уменьшать нарушения моторно-координационной функции была продемонстрирована на 21 день после создания церебрального фототромбоза в тесте “цилиндр” [4].

В тесте “открытое поле” ОДА и ПИА у контрольной группы достоверно снизились в 5,6 и 5,3 раза, при этом ЭЛ и Аг повышались в 3,6 и 2,6 раза, по сравнению с исходным уровнем (табл. 3). У животных, получавших ФДЭС в дозе 10 и 75 мг/кг, ОДА также уменьшалась в 1,76 и 2,75 раза соответственно, однако это снижение было достоверно меньшим, чем в контрольной группе. При этом группы, получавшие ФДЭС в дозе 10 и 75 мг/кг, достоверно различались между собой только по показателю ПИА, снижение составило 2 и 3,1 раза, по сравнению с исходными данными. ЭЛ и

Таблица 3. Влияние исследуемых препаратов на поведение крыс с ишемией головного мозга в тесте “открытое поле” ( $M \pm SD$ )

| Группа                  | ОДА, у. е.                      | ПИА, у. е.                     | Аг, у. е.                      | ЭЛ, у. е.                      |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Исходный уровень</b> |                                 |                                |                                |                                |
| ЛО                      | 48,14 $\pm$ 7,57                | 11,14 $\pm$ 0,70               | 1,85 $\pm$ 0,26                | 2,00 $\pm$ 0,30                |
| Контрольная             | 52,25 $\pm$ 7,30                | 12,00 $\pm$ 0,83               | 2,00 $\pm$ 0,11                | 1,50 $\pm$ 0,28                |
| ФДЭС 10 мг/кг           | 50,33 $\pm$ 4,25                | 12,83 $\pm$ 0,70               | 1,16 $\pm$ 0,40                | 1,33 $\pm$ 0,49                |
| ФДЭС 75 мг/кг           | 51,14 $\pm$ 4,38                | 11,14 $\pm$ 1,47               | 1,42 $\pm$ 0,29                | 1,00 $\pm$ 0,30                |
| Деанола ацеглумат       | 49,25 $\pm$ 12,5                | 11,25 $\pm$ 1,25               | 2,00 $\pm$ 0,70                | 1,41 $\pm$ 0,70                |
| Цитиколин               | 55,83 $\pm$ 4,54                | 11,33 $\pm$ 0,55               | 1,83 $\pm$ 0,16                | 1,83 $\pm$ 0,74                |
| Цитофлавин              | 50,6 $\pm$ 6,84                 | 12,00 $\pm$ 0,83               | 2,00 $\pm$ 0,28                | 1,20 $\pm$ 0,50                |
| <b>Через 21 день</b>    |                                 |                                |                                |                                |
| ЛО                      | 41,57 $\pm$ 7,27                | 9,85 $\pm$ 0,41                | 1,57 $\pm$ 0,52                | 2,00 $\pm$ 0,30                |
| Контрольная             | 9,25 $\pm$ 1,31 <sup>1</sup>    | 2,25 $\pm$ 0,47 <sup>1</sup>   | 5,25 $\pm$ 0,85 <sup>1</sup>   | 5,50 $\pm$ 0,86 <sup>1</sup>   |
| ФДЭС 10 мг/кг           | 28,50 $\pm$ 6,90 <sup>1,2</sup> | 6,33 $\pm$ 0,66 <sup>1,2</sup> | 2,00 $\pm$ 0,50 <sup>2</sup>   | 3,00 $\pm$ 0,51 <sup>1,2</sup> |
| ФДЭС 75 мг/кг           | 18,57 $\pm$ 5,80 <sup>1,2</sup> | 3,57 $\pm$ 0,43 <sup>1,2</sup> | 2,42 $\pm$ 0,68 <sup>1,2</sup> | 3,70 $\pm$ 0,68 <sup>1,2</sup> |
| Деанола ацеглумат       | 20,00 $\pm$ 10,83 <sup>1</sup>  | 3,00 $\pm$ 0,68 <sup>1</sup>   | 2,75 $\pm$ 1,10                | 3,75 $\pm$ 1,93                |
| Цитиколин               | 18,00 $\pm$ 3,53 <sup>1,2</sup> | 3,00 $\pm$ 0,33 <sup>1</sup>   | 3,25 $\pm$ 0,20 <sup>1,2</sup> | 3,00 $\pm$ 0,33 <sup>2</sup>   |
| Цитофлавин              | 20,33 $\pm$ 2,02 <sup>1,2</sup> | 3,66 $\pm$ 0,93 <sup>1</sup>   | 4,33 $\pm$ 0,88 <sup>1</sup>   | 3,66 $\pm$ 0,67 <sup>1,2</sup> |

<sup>1</sup> Достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Аг в данных группах повышены в 2,25 и 1,72 раза и 3,7 и 1,7 раза.

Важно отметить, что ФДЭС в дозе 10 мг/кг достоверно превосходил действие цитиколина по влиянию на показатели ОДА в 1,5 раза, ПИА — в 2,11 и Аг — в 1,62 раза. Отличия от цитофлавина были минимальны и характеризовались только повышением ПИА в группе ФДЭС 10 мг/кг в 1,72 раза.

Ранее показано, что введение деанола ацеглума в дозе 10 мг/кг при ишемических нарушениях мозгового кровообращения препятствует снижению горизонтальных перемещений животных на 1, 3 и 4 неделе наблюдения и количества вертикальных стоек на 4 неделе эксперимента, а также существенным образом активизирует исследовательскую активность животных в течение всего периода наблюдений (на 10,8 – 22,5 %) [3].

Таким образом, новое соединение аминоксанола с бутандиовой и ФДЭС на модели ишемии головного мозга, вызванной двусторонней перманентной перевязкой общих сонных артерий у крыс, уменьшает выраженность неврологического дефицита у животных.

## ВЫВОДЫ

1. При курсовом пероральном введении новое соединение ФДЭС — (2Е)-4-[2-(диэтиламино)этоксиг]-4-оксобут-2-еновой кислоты бутандиоат (2:1) — в дозе 10 мг/кг способствует снижению неврологического дефицита в 3 раза ( $p < 0,05$ ) и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения у крыс на фоне ишемии головного мозга, вызванной двусторон-

ней необратимой перевязкой общих сонных артерий, в среднем в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ).

2. Оптимальная нейротропная доза нового соединения при курсовом пероральном введении составляет 10 мг/кг.

3. Нейропротекторная активность ФДЭС сопоставима с таковой для цитиколина и цитофлавина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Бульон, И. Б. Крылова, Н. Р. Евдокимова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **137**(4), 467 – 470 (2004).
2. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов, П. Р. Камчатнов, *Вестник РГМУ*, **51**(4), 28 – 32 (2006).
3. Т. И. Макарова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Купавна (2007).
4. K. Diedrich, K. Frauenknecht, J. Minnerup, K. Barbara, *Stroke*, **43**(7), 1931 – 1940 (2012).
5. A. D. Lopez, C. D. Mathers, M. Ezzati, et al., *Lancet*, **367**(9524), 1747 – 1757 (2006).
6. J. Mackay, G. Mensah, Geneva, *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, World Health Organization (2004).
7. F. J. Martin-Arenas, C. O. Pintado, *Proceedings of Measuring Behavior*, August 27 – 29, Wageningen (2014).
8. J. T. O'Brien, T. Erkinjuntti, B. Reisberg, et al., *Lancet Neurol.*, **2**(2), 89 – 98 (2003).
9. P. M. Rothwell, A. J. Coull, L. E. Silver, et al., *Lancet*, **366**(9499), 1773 – 1783 (2005).
10. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators, *J. Clin. Epidemiol.*, **41**(2), 105 – 114 (1988).
11. M. Zülküf Önal, F. Li, T. Tatlisumak, et al., *Stroke*, **28**(5), 1060 – 1065 (1997).

Поступила 14.05.17

## NEUROTROPIC ACTIVITY OF A NEW AMINOETHANOL DERIVATIVE UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA

I. A. Titovich, Y. I. Sysoev, V. C. Bolotova, and S. V. Okovityi

St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, ul. Prof. Popova 14, St. Petersburg, 197376 Russia

The neurotropic activity of a new aminoethanol derivative with butanediol and *trans*-ethylene-1,2-dicarboxylic acid, (2E)-4-[2-(diethylamino)ethoxy]-4-oxobut-2-ene butanediolate (2 : 1), has been studied during course peroral introduction (10 mg/kg) in rats with experimental cerebral ischemia caused by bilateral permanent occlusion of both common carotid arteries. The animals were tested with respect to orientation-exploratory behavior and coordination of movements in rotarod and open-field tests. The new agent activity was comparable with that of reference drugs citicoline (500 mg/kg) and cytoflavin (170 mg/kg).

**Keywords:** ischemic stroke; rotarod test; open field test; FDES; citicoline; cytoflavin; deanol aceglumate; rats.