



Санкт-Петербургский
Государственный Химико-
фармацевтический
Университет



КАФЕДРА ФАРМАКОЛОГИИ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ
Санкт-Петербургский Государственный Химико-Фармацевтический Университет

Сысоев Юрий Игоревич

**ВЛИЯНИЕ АДРЕНОТРОПНЫХ И ХОЛИНОТРОПНЫХ
СРЕДСТВ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНЫХ
ФУНКЦИЙ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЦНС
(экспериментальное исследование)**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология
03.03.01 Физиология

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор
Оковитый Сергей Владимирович

Доктор медицинских наук
Мусиенко Павел Евгеньевич

Санкт-Петербург, 2020

Актуальность работы

Препараты с **адрено-** и **холинотропным** действием являются одними из наиболее эффективных в лечении повреждении ЦНС [Chau C., 1998a; Musienko P.E., 2011].

Показана эффективность агонистов **альфа-2 адренорецепторов** в качестве средств, способных снижать выраженность неврологического дефицита как в условиях эксперимента [Yanli L., 2016], так и у людей [Jiang L., 2017].

Доказано, что альфа-2 адренорецепторы участвуют в инициации и модуляции локомоции, однако роль подтипов данных рецепторов в этих процессах на сегодняшний день не изучена [Musienko P.E., 2011].

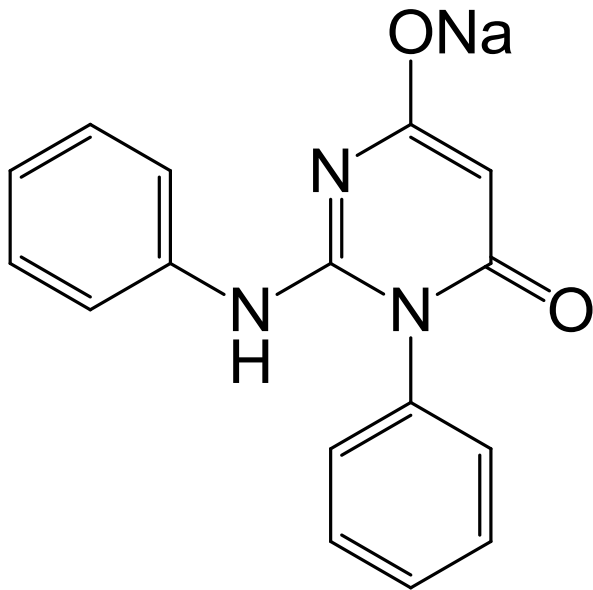
Холинотропные средства традиционно применяются в терапии нейродегенеративных заболеваний [Jacobson S.A., 2008], коррекции последствий ишемического инсульта [Barrett K.M., 2011], а также черепно-мозговой травмы [Tenovuo O.S., 2006].

Производные этаноламина традиционно рассматриваются как не прямые холиномиметики, обладающие нейроротекторным действием [Kewitz H., 1976].

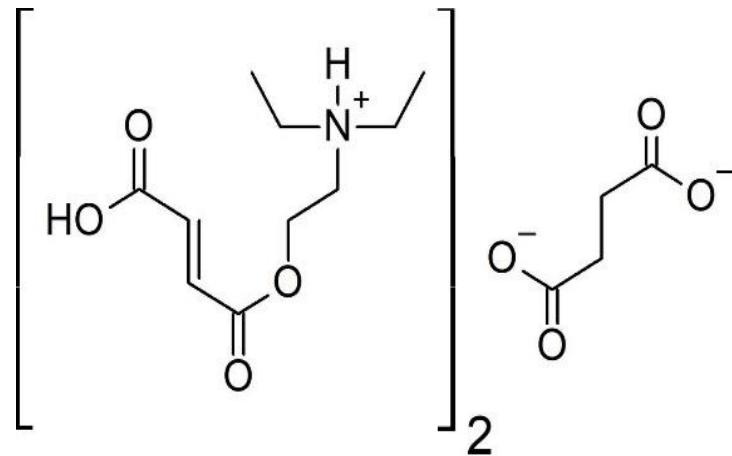
Chau C., Barbeau H., Rossignol S. // Journal of neurophysiology. 1998. № 1 (79). С. 392–409. Musienko P. [и др.]. // Journal of Neuroscience. 2011. № 25 (31). С. 9264–9278. Yanli L. [и др.]. // European Journal of Pharmacology. 2016. (793). С. 89–94. Jiang L. [и др.]. // Journal of Clinical Anesthesia. 2017. № 40. С. 25–32. Jacobson S.A., Sabbagh M.N. // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2008. Barrett K.M. [и др.]. // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. 2011. Tenovuo O.S. // Current drug therapy. 2006. Kewitz H., Pleul O. // Proc Natl Acad Sci USA. 1976. № 7 (73). С. 2181–2185.

Цель исследования

- Изучить влияние средств с адренотропным (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (**мафедин**)) и холинотропным (бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (**ФДЭС**)) действием на восстановление двигательных функций при травматическом повреждении ЦНС.



Мафедин



ФДЭС

Задачи исследования

- 1) Выявить роль альфа- 2_A -, 2_B - и 2_C -адренорецепторов в нейромодуляции локомоции.
- 2) Оценить избирательность действия мафедина на альфа-2 адренорецепторы.
- 3) Изучить механизм нейропротекторного эффекта ФДЭС.
- 4) Исследовать влияние мафедина и ФДЭС на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы.

Положение, выносимое на защиту

- 1) Альфа-2_c адренорецепторы играют ключевую роль в регуляции двигательной функции. Их блокада приводит к негативным изменениям **кинематических** и **электромиографических** характеристик локомоторного паттерна, а также **рефлекторной активности спинного мозга**.

Материалы и методы

Модель - децеребрированная кошка, преколликулярная постмамиллярная децеребрация, ламинэктомия между L3 и L7 [Gerasimenko P.E., 2003; Musienko P.E., 2007].

Тестирование животных начиналось спустя 6-8 часов после децеребрации

Оценивались параметры **3 разных типов локомоции**, вызванных:

- механической стимуляцией хвоста [Rossignol S., 2002]
- электрической эпидуральной стимуляцией [Iwahara T., 1992; Gerasimenko Y.P., 2003]
- электрической эпидуральной стимуляцией и одновременным пассивным движением передних лап [Gerasimenko, 2009]

Анализ кинематики

- Видеозаписи анализировали в покадровом режиме и рассчитывали:

- **углы** в тазобедренном, коленном, голеностопном и плюснефаланговом суставах в фазы F, E1 и E3 (F – фаза максимального сгибания коленного сустава, E1 – начало фазы опоры, E3 – конец фазы опоры);

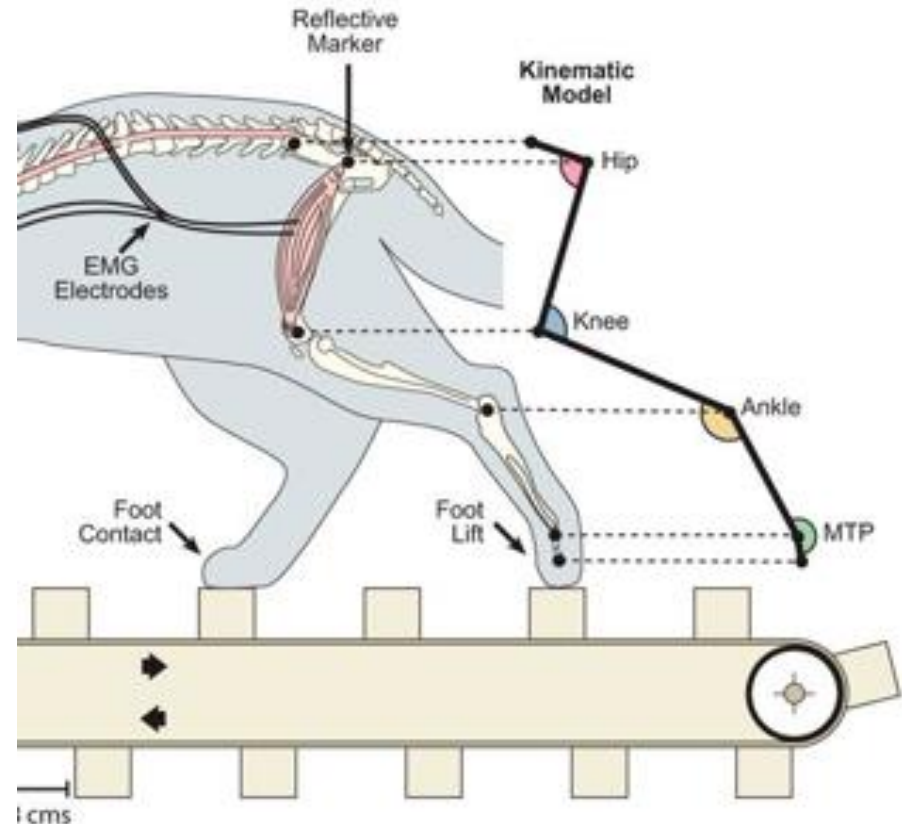
- **длительность цикла** фазы, отдельно длительность фазы опоры и переноса

- максимальную **длину опоры**;

- **длину переноса** кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов;

- максимальную **высоту подъема** кончика стопы, плюснефалангового, голеностопного и коленного суставов;

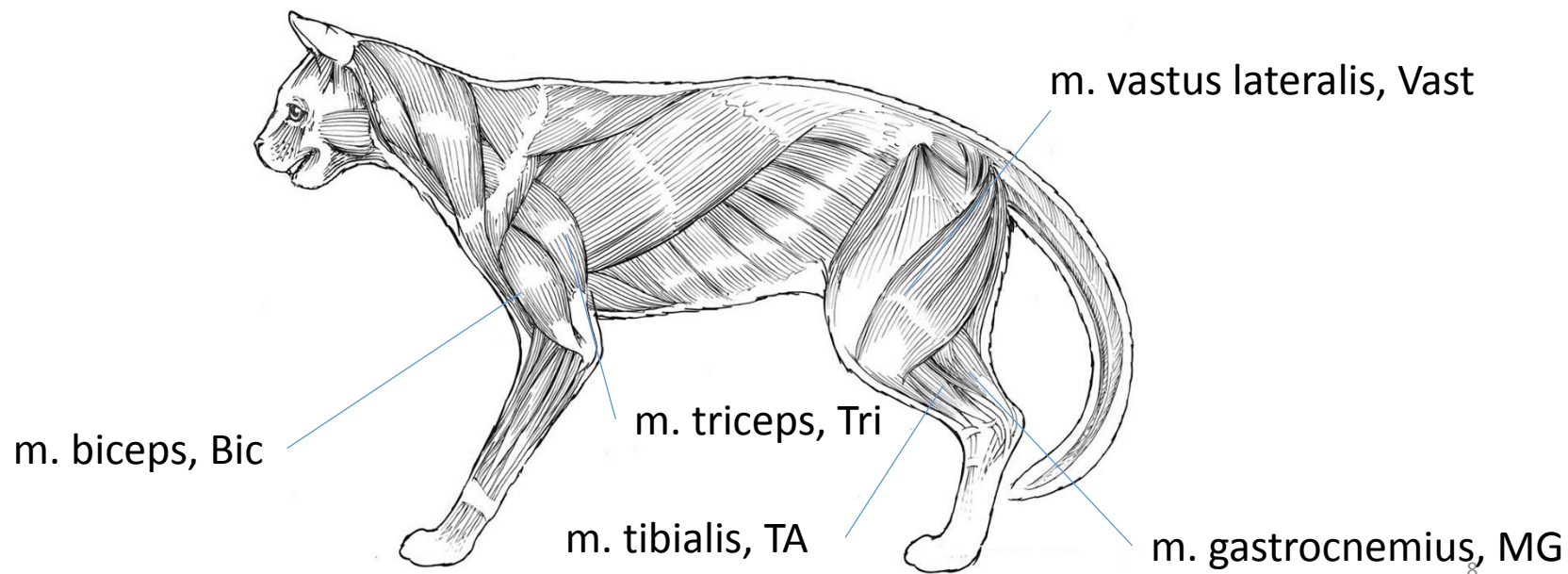
- внутриконечностную **координацию**.



Escalona, 2017

Анализ миографической активности

- Биполярные электромиографические (EMG) электроды имплантировались билатерально в мышцы: **m. gastrocnemius lateralis, MG**, (разгибатель голеностопного сустава), **m. vastus lateralis, Vast**, (разгибатель коленного сустава) и в **m. tibialis anterior, TA**, (сгибатель голеностопного сустава).
- Также электроды имплантировались в двуглавую (Bic) и трехглавую (Tri) мышцы левой передней лапы.



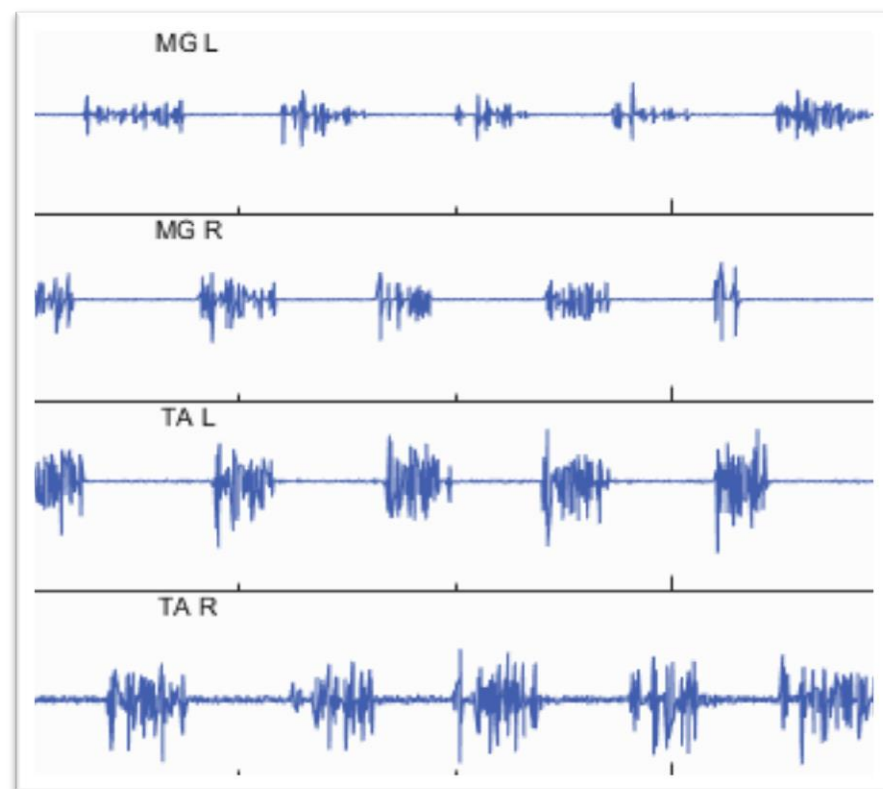
Анализ миографической активности

Для каждой пачки мышц рассчитывали:

- длительность пачки;
- максимальную амплитуду;
- площадь под кривой;
- межпачечный интервал.

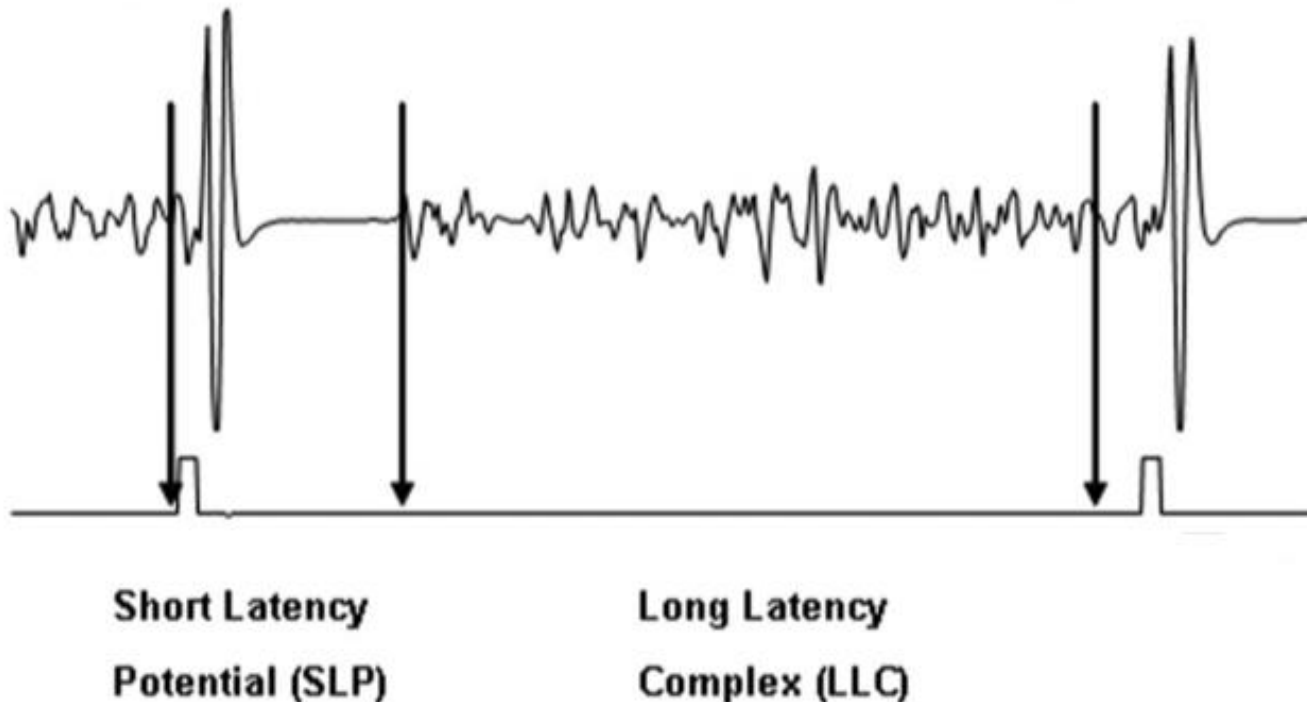
Для каждой двух последовательных пар пачек рассчитывали **асимметрию** длительности пачек.

Дополнительно оценивали уровень реципрокности и уровень кросскорреляции пар мышц **Vic-TA L**, **MG L-TA L**, **TA L-TA R**, **Vic-TA R** и уровень межконечностной координации по паре мышц **TA L-TA R**.



Анализ ВП

Анализ кривых вызванных потенциалов, полученных при эпидуральной стимуляции током от 100 мкА с частотой 0.3 Гц, включал в себя расчет максимальной амплитуды **ранних компонентов** (3-30 мс, Short Latency Potential) и **поздних компонентов** (30-100 мс, Long Latency Complex) [Musienko P.E., 2009].



Антагонисты альфа-2 адренорецепторов

Антагонист **альфа-2_A** адренорецепторов – BRL 44408 (Tocris Bioscience, UK)

Антагонист **альфа-2_B** адренорецепторов – ARC 239 (Tocris Bioscience, UK)

Антагонист **альфа-2_C** адренорецепторов – JP 1302 (Tocris Bioscience, UK).

Все соединения вводились интратекально, запись локомоции начинали спустя 20 минут после введения. Между условиями делали часовой перерыв для восстановления базового уровня.

Эффекты альфа-2_A антагониста на локомоцию и ВП

Параметры	Механическая стимуляция хвоста	Эпидуральная стимуляция	Эпидуральная стимуляция+пассивное движение передних лап
Кинематика	Отсутствие эффекта		
EMG	Отсутствие эффекта	↓ максимальной амплитуды сгибателей ↑ максимальной амплитуды разгибателей	Отсутствие эффекта
ВП	Отсутствие эффекта		

Эффекты альфа-2_B антагониста на локомоцию и ВП

Параметры	Механическая стимуляция хвоста	Эпидуральная стимуляция	Эпидуральная стимуляция+пассивное движение передних лап
Кинематика	↑длины опоры	Отсутствие эффекта	↑угла коленного сустава в фазу F, ↑угла голеностопного сустава в фазу F, ↓длительности фазы переноса, ↓высоты подъема коленного сустава, ↓высоты подъема кончика стопы
EMG	↑площади под кривой сгибателей	Отсутствие эффекта	↓максимальной амплитуды разгибателей ↓площади под кривой сгибателей
ВП	Отсутствие эффекта		

Эффекты альфа-2_c антагониста на локомоцию и ВП

Параметры	Механическая стимуляция хвоста	Эпидуральная стимуляция	Эпидуральная стимуляция+пассивное движение передних лап
Кинематика	↓ длины переноса коленного сустава	↓ угла голеностопного сустава в фазу ЕЗ	↓ максимальной длины опоры
EMG	↑ площади под кривой сгибателей	↓ максимальной амплитуды разгибателей ↓ максимальной амплитуды сгибателей ↓ площади под кривой разгибателей	↓ максимальной амплитуды разгибателей ↓ площади под кривой разгибателей, ↑ длительности межпачечного интервала сгибателей и разгибателей
ВП	↓ амплитуды ранних ответов сгибателей и разгибателей ↓ амплитуды поздних ответов сгибателей и разгибателей		

Положение, выносимое на защиту

- 2) **Мафедин** уменьшает объем повреждения и интенсивность воспаления в мозге после травмы, увеличивает общую двигательную активность животных и улучшает двигательную функцию конечностей. Эффекты мафедина на двигательные поведенческие параметры связаны с активацией **альфа-2_c** адренорецепторов.

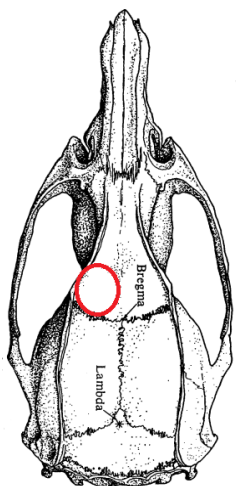
Материалы и методы

Эксперимент	Мафедин ЧМТ
Лабораторные животные	Крысы 250-300 г По 10 в группе
Объект исследования	Мафедин 2,5 и 5 мг/кг
Препараты сравнения (Эксперимент 1)	Клонидин 40 мкг/кг
Антагонисты (Эксперимент 2)	Йохимбин (эквимольно мафедину 2,5 мг/кг)
Способы введения препаратов	внутрибрюшинно

Модель черепно-мозговой травмы

После проведения трепанации в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры (на 3,0 мм ростральнее и 2,0 мм медиальнее брегмы), в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз весом 50 г.

Высверленную пластину возвращали на место и ушивали разрез кожи [Isaev N.K., 2012].



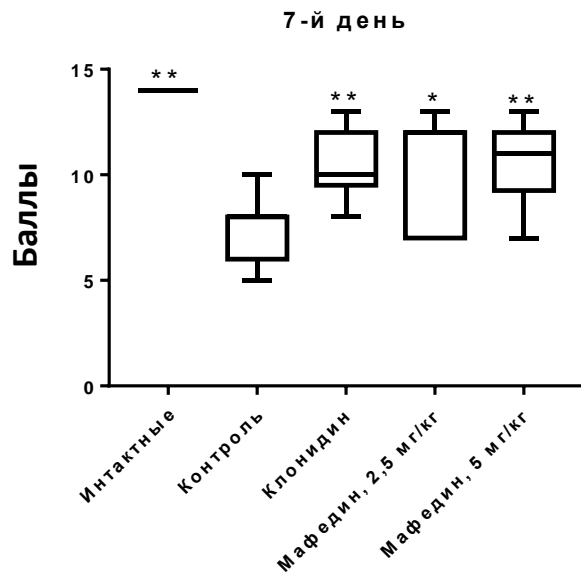
Расписание экспериментов

День травмы	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	6-й день	7-й день
Утро: ЧМТ ↓ 1 час спустя травмы: введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ОП» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ПКЛ» ↓ «Цилиндр» ↓ «Staircase test» ↓ «Сужающаяся дорожка» ↓ Взятие биоматериала

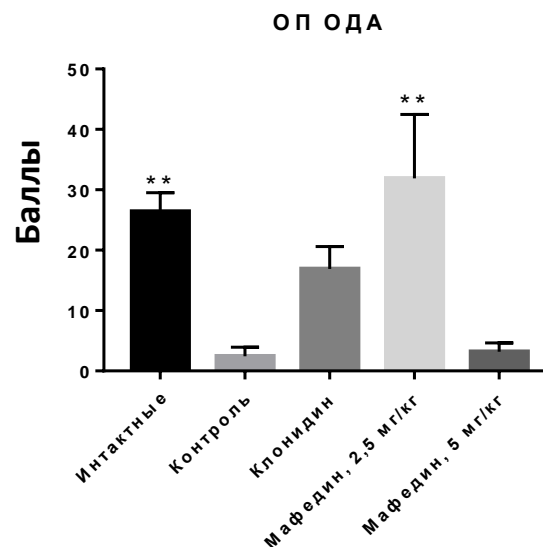
Примечание: «ОП» - открытое поле, «ПКЛ» - приподнятый крестообразный лабиринт

Эффекты мафедина у крыс с ЧМТ

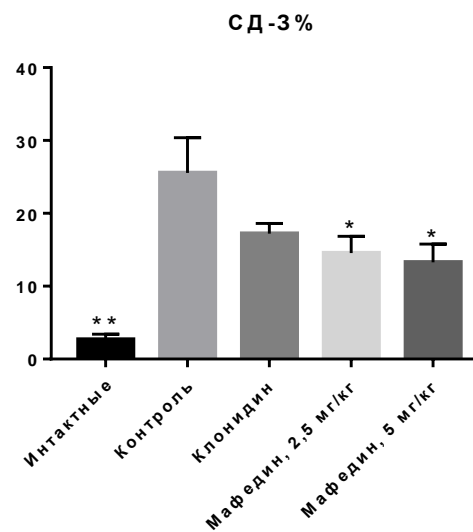
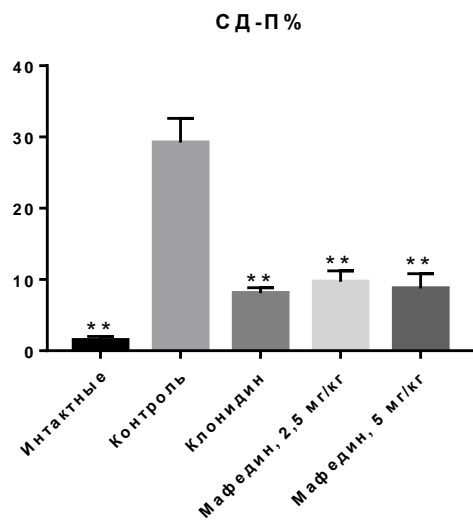
Стимулирование конечностей



«Открытое поле», 3-й день

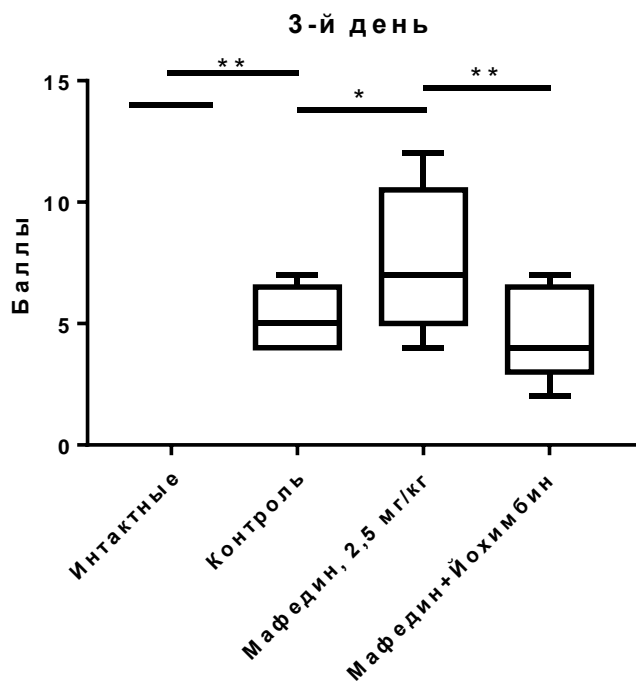


Сужающаяся дорожка, 7-й день

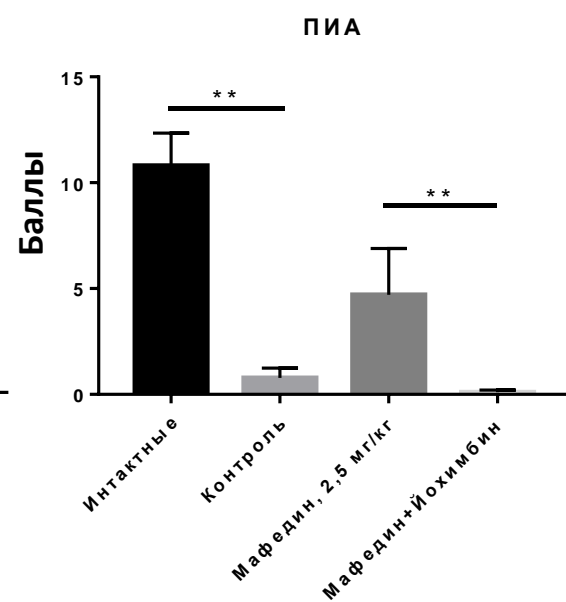
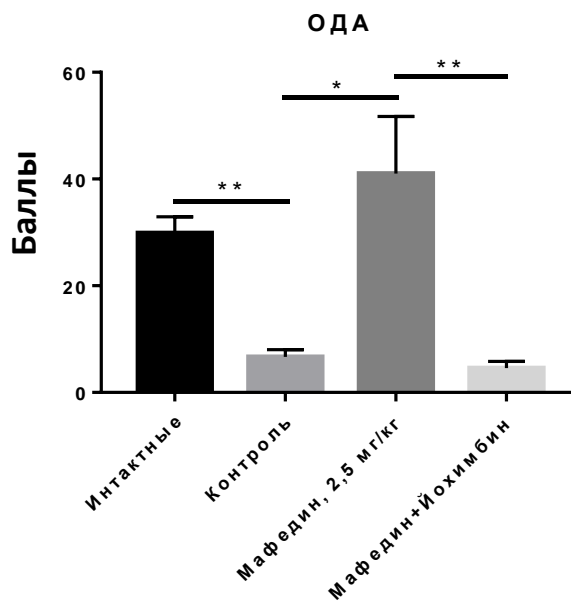


Эффекты мафедина и йохимбина у крыс с ЧМТ (Эксперимент 2)

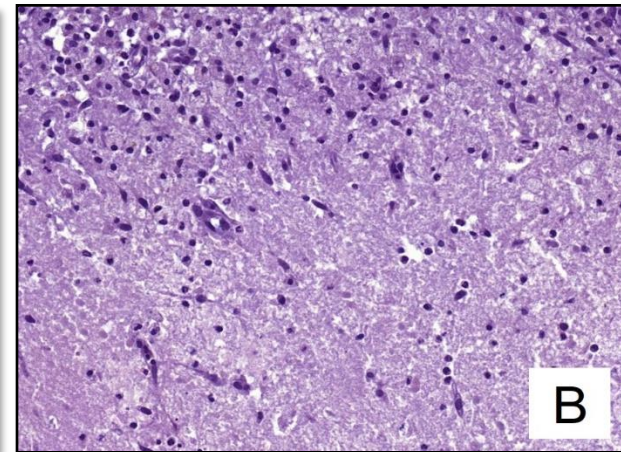
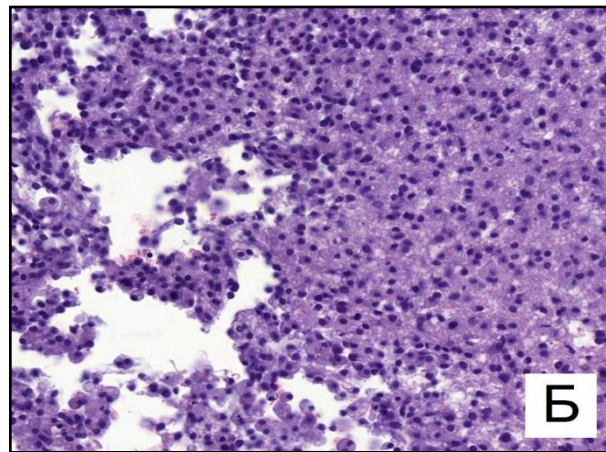
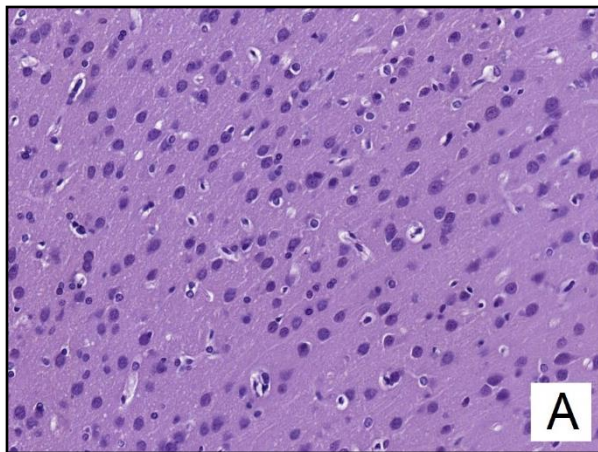
Стимулирование конечностей



«Открытое поле»



Морфологическая оценка эффекта мафедина у крыс с ЧМТ

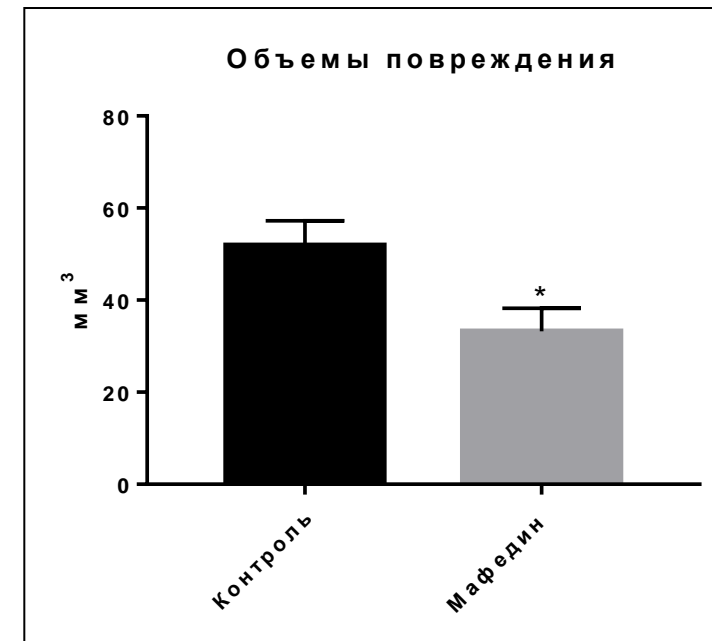


А - головной мозг нетравмированного полушария травмированных животных на 7-е сутки после травмы.

Б - головной мозг травмированного полушария животных на 7-е сутки после травмы.

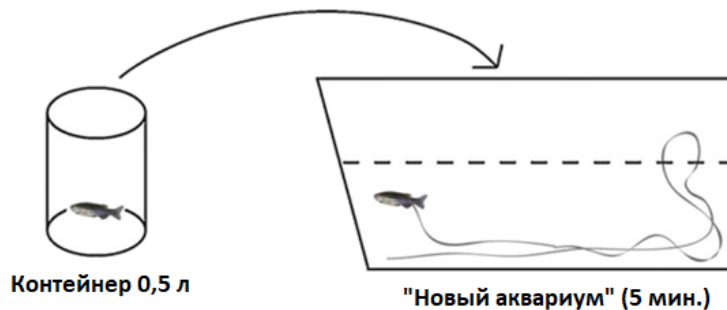
В - Ткань головного мозга травмированного полушария животных, которым вводили мафедин в дозе 2,5 мг/кг в течение 7 дней.

А, Б, В – Окраска гематоксилином и эозином. ув. x400



Изучение избирательности рецепторного действия мафедина

- Исследование было выполнено на взрослых особях (5-7 месяцев) *Danio rerio* дикого короткоплавникового типа.
- Поведенческое тестирование осуществляли в **тесте «новый аквариум» (НА)**.
- Перед началом теста рыбы находились в течение 20 мин в специальных непрозрачных пластиковых контейнерах объемом 0.5 л, содержащих либо воду, либо раствор тестируемого средства в определенной концентрации.



Эксперимент 1. Острый эксперимент. Контроль и мафедин 60 мг/л

Эксперимент 2. Острый эксперимент. Контроль, мафедин 60 мг/л, мафедин 60 мг/л+JP 1302 (антагонист альфа-2_c адренорецепторов) 90 мг/л

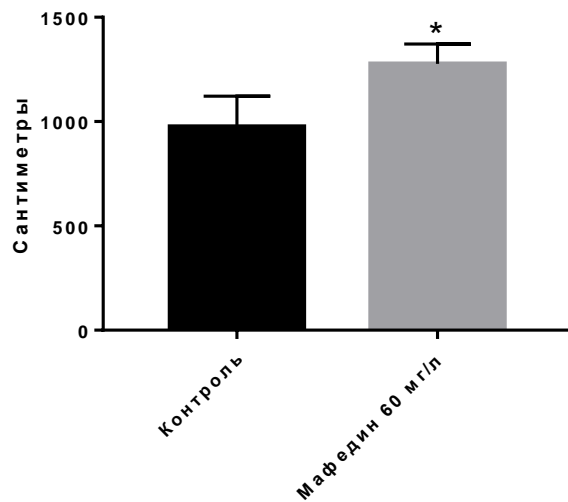
Эксперимент 3. Хронический эксперимент, 7-дневное введение мафедина в дозах 1, 5 и 10 мг/л

Для каждого животного **оценивали:**

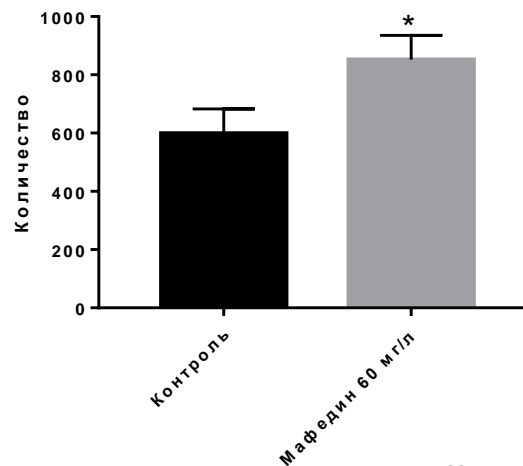
- длину пройденной дистанции (см);
- среднюю и максимальная скорость (см/сек);
- угол поворота (град);
- частоту и длительность состояния низкой мобильности;
- частоту и длительность состояния высокой мобильности;
- частоту и длительность замираний;
- время проведенное в верхней и нижней частях танка (сек.);
- частоту всплытий и время первого всплытия.

Эффекты мафедина в остром эксперименте

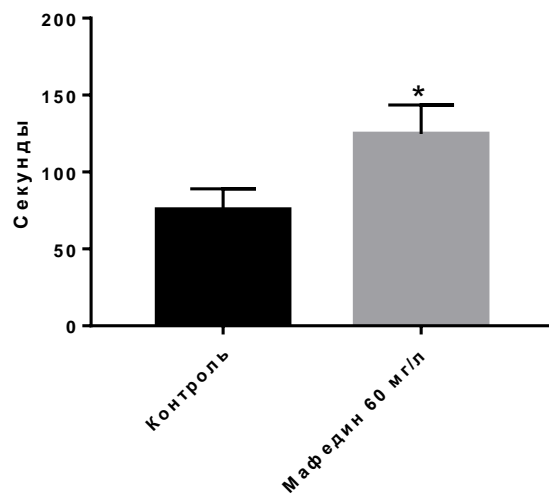
Проплытая дистанция



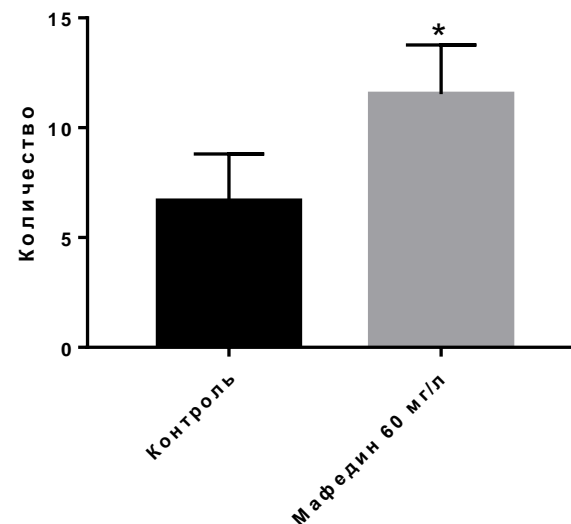
Низкая мобильность - частота



Время в нижней части бассейна

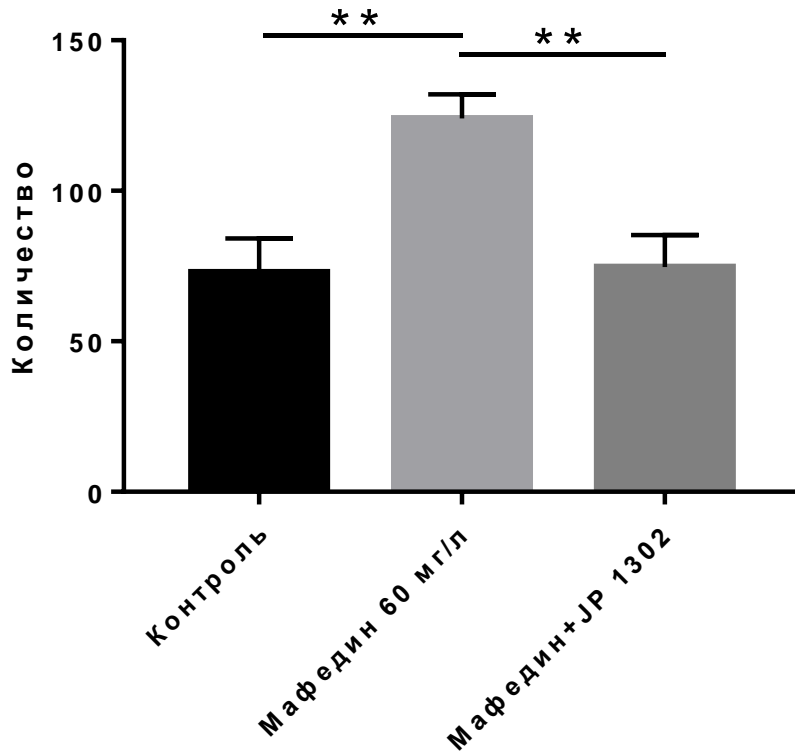


Частота всплытий в верхнюю часть бассейна

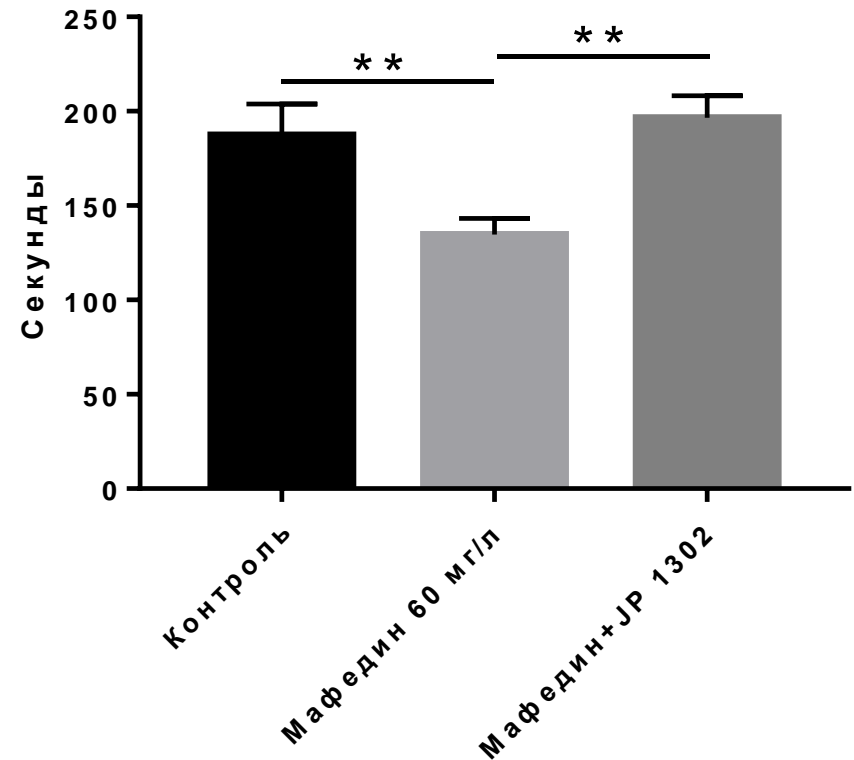


Эффекты мафедина и JP 1302

Количество ускорений

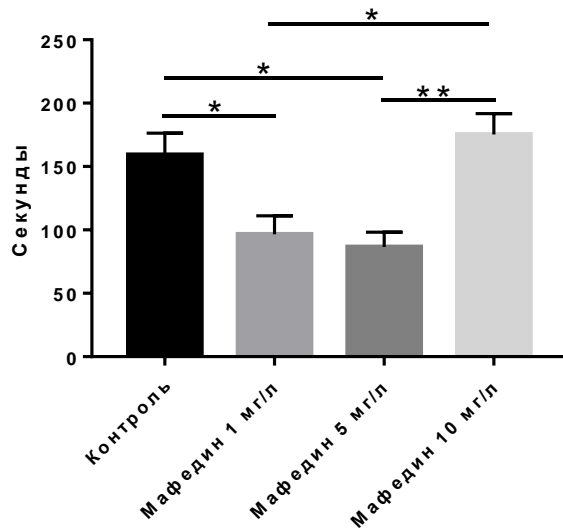


Время нахождения в нижней части бассейна

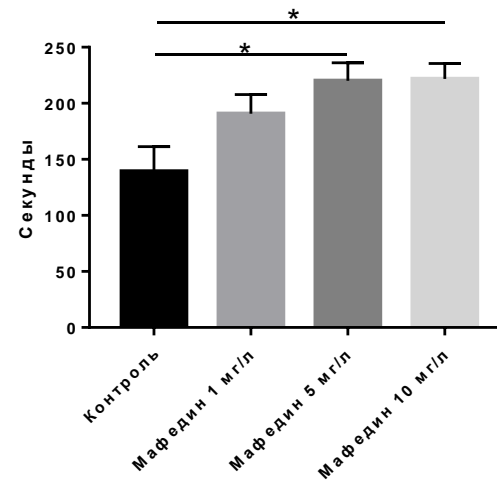


Эффекты 7-дневного введения мафедина

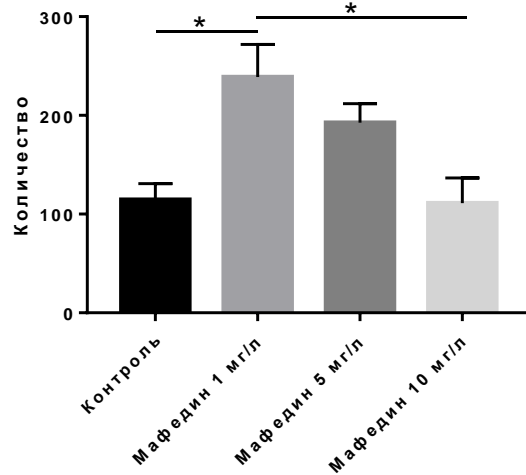
Низкая мобильность - время



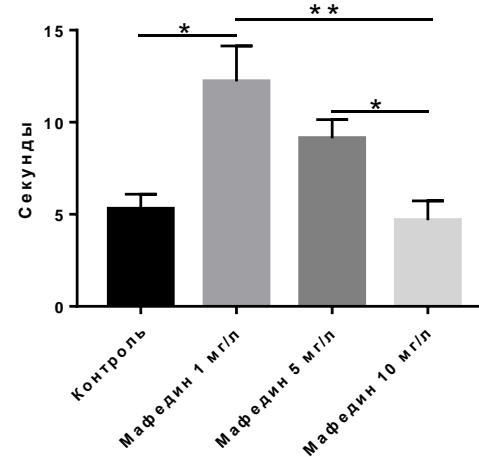
Время нахождения в нижней части бассейна



Высокая мобильность - частота



Высокая мобильность - время



Положение, выносимое на защиту

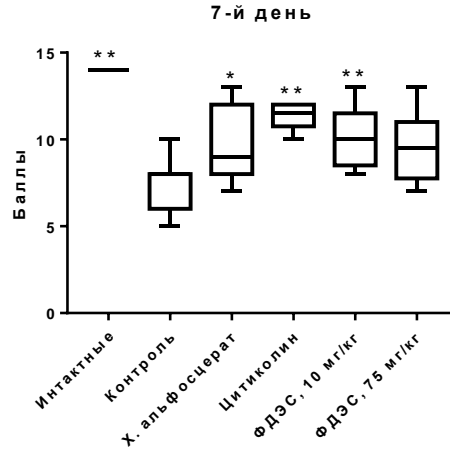
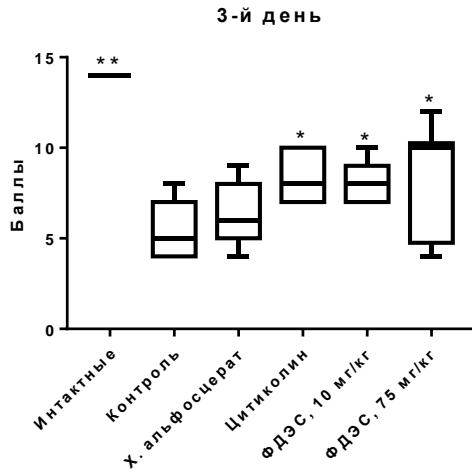
- 3) **ФДЭС**, не влияя на объем повреждения мозга, увеличивает общую двигательную активность крыс после черепно-мозговой травмы и нормализует двигательную функцию конечностей. Нейропротекторное действие ФДЭС реализуется за счет активации **нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК)** в постсинаптические дендритные шипики нейронов.

Материалы и методы

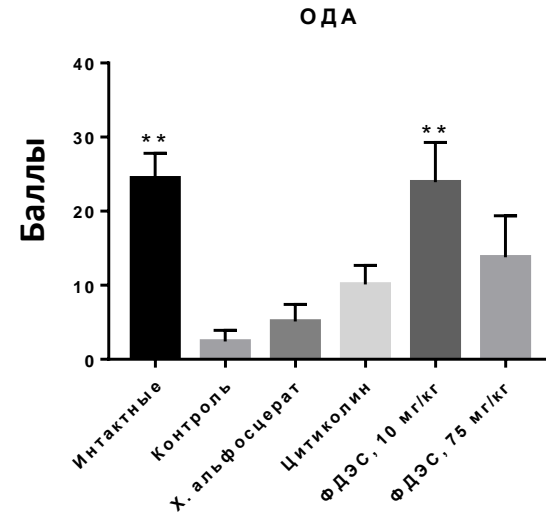
Эксперимент	ФДЭС
Лабораторные животные	Крысы 250-300 г По 10 в группе
Объект исследования	ФДЭС 10 и 75 мг/кг
Препараты сравнения (Эксперимент 1)	Холина альфосцерат 100 мг/кг Цитиколин 500 мг/кг
Антагонисты (Эксперимент 2)	Скополамин (эквимолярно ФДЭС 10 мг/кг)
Способы введения препаратов	внутрибрюшинно

Эффекты ФДЭС у крыс с ЧМТ

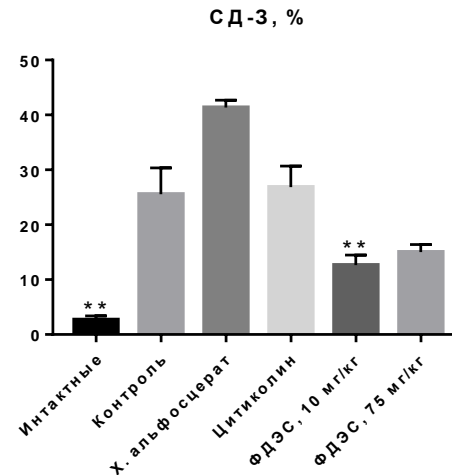
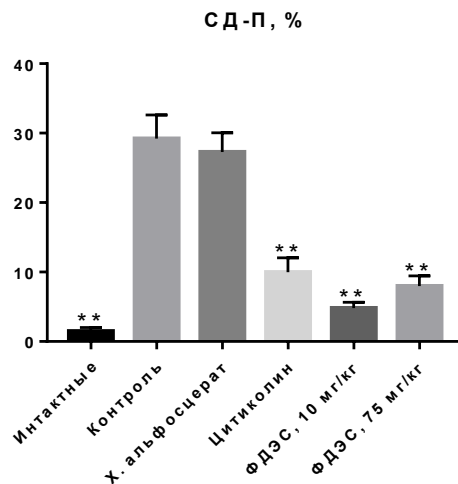
Стимулирование конечностей



«Открытое поле», 3-й день

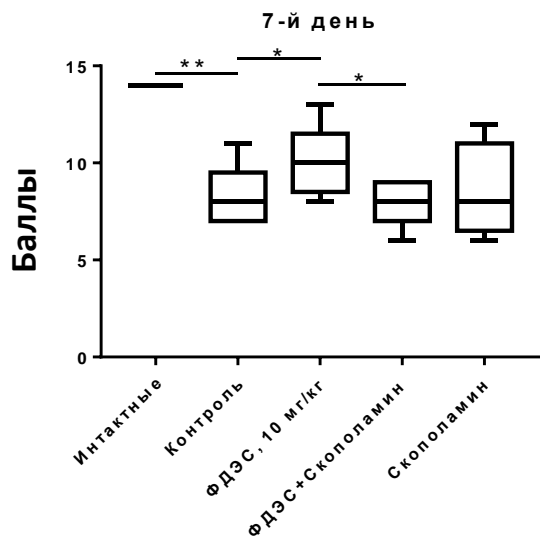


Сужающаяся дорожка, 7-й день

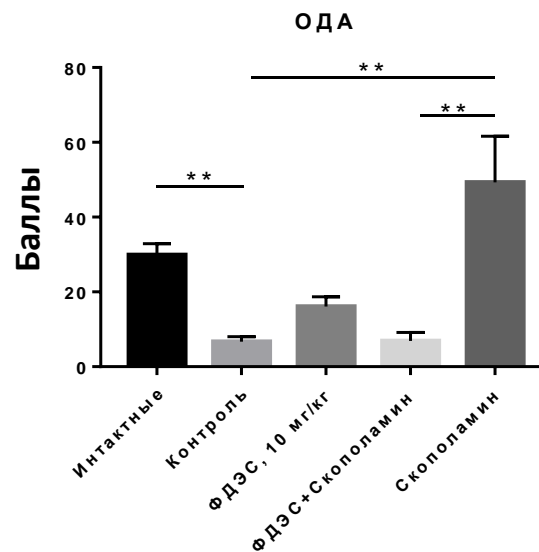


Эффекты ФДЭС и скополамина у крыс с ЧМТ

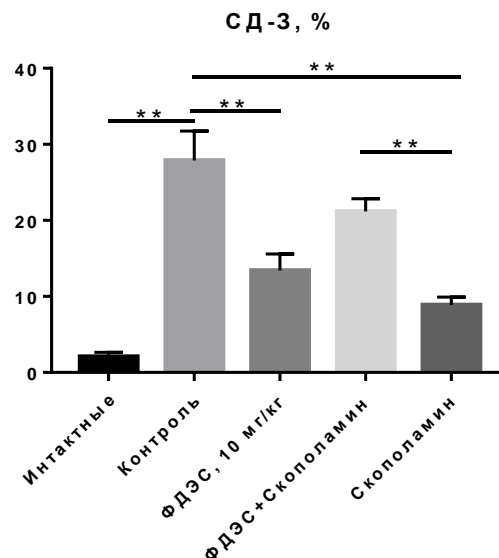
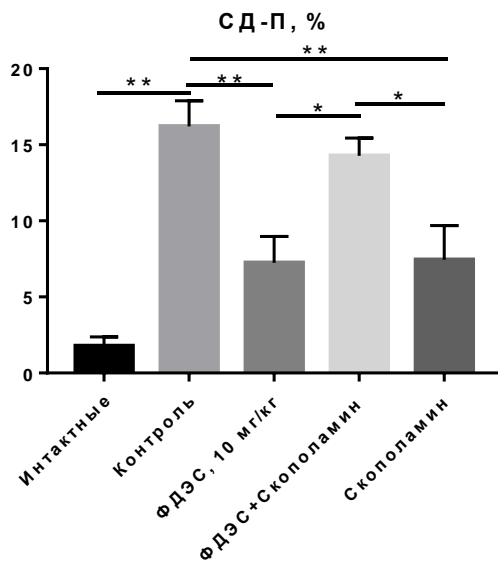
Стимулирование конечностей



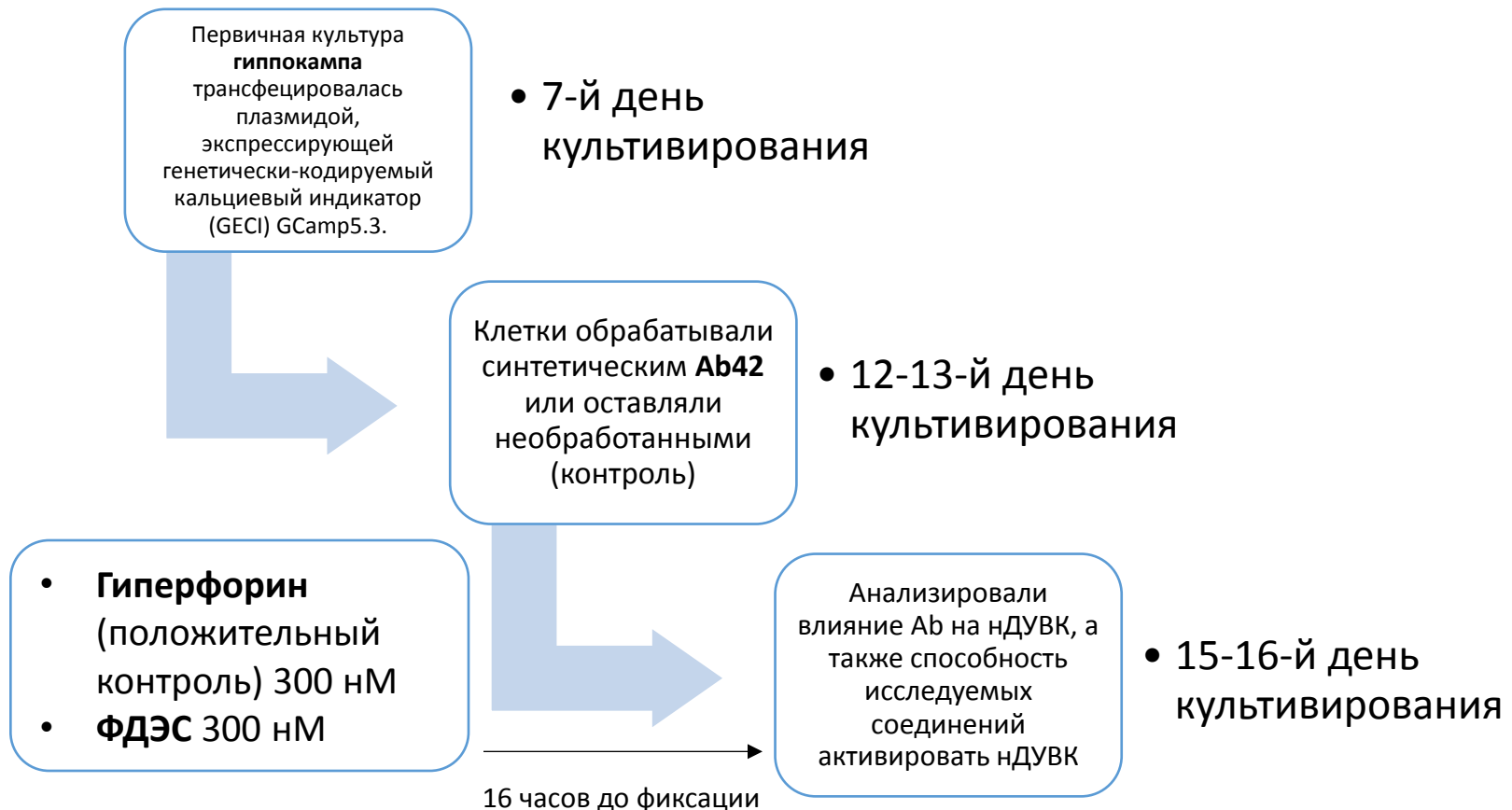
«Открытое поле», 3-й день



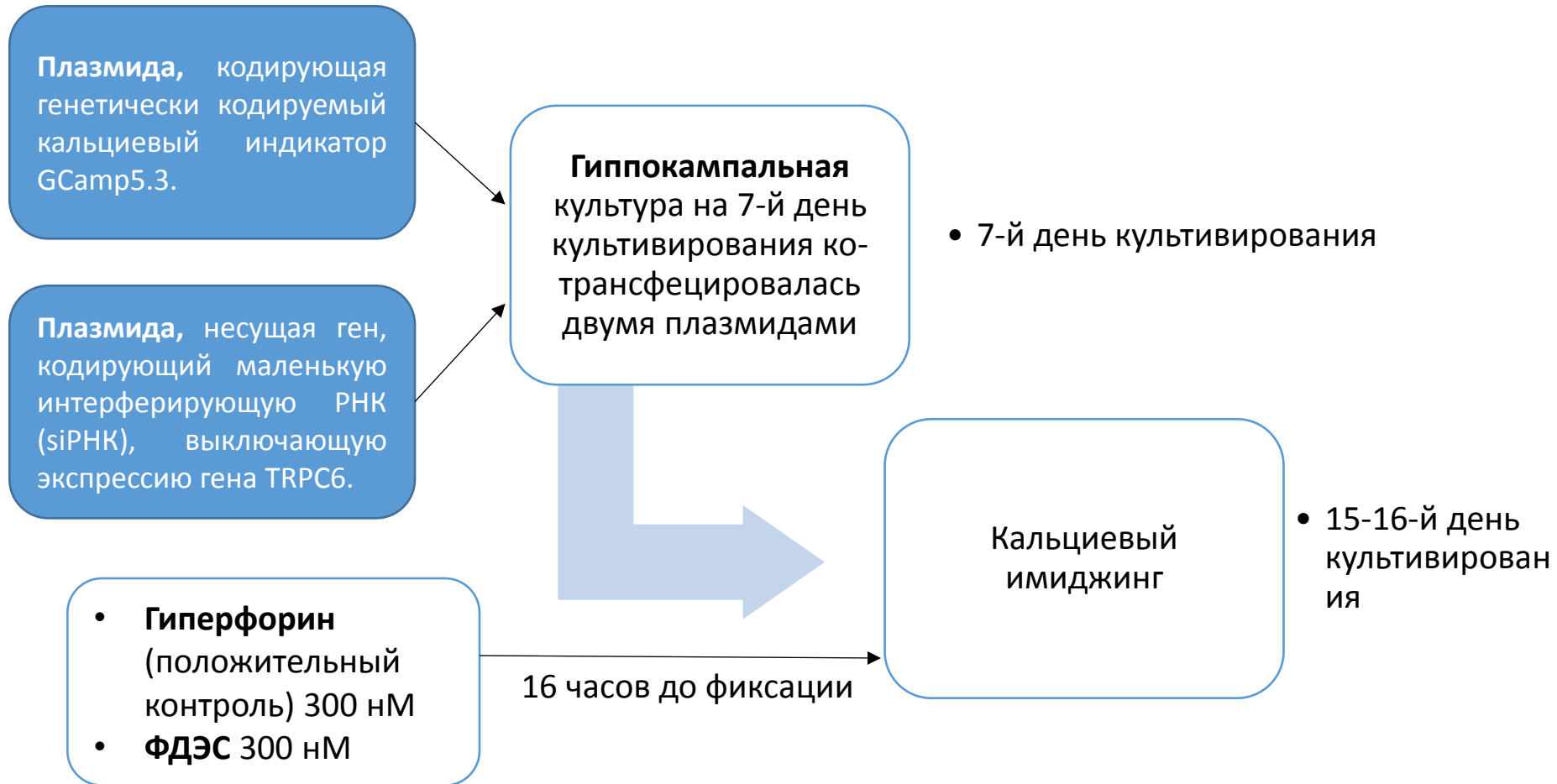
Сужающаяся дорожка, 7-й день



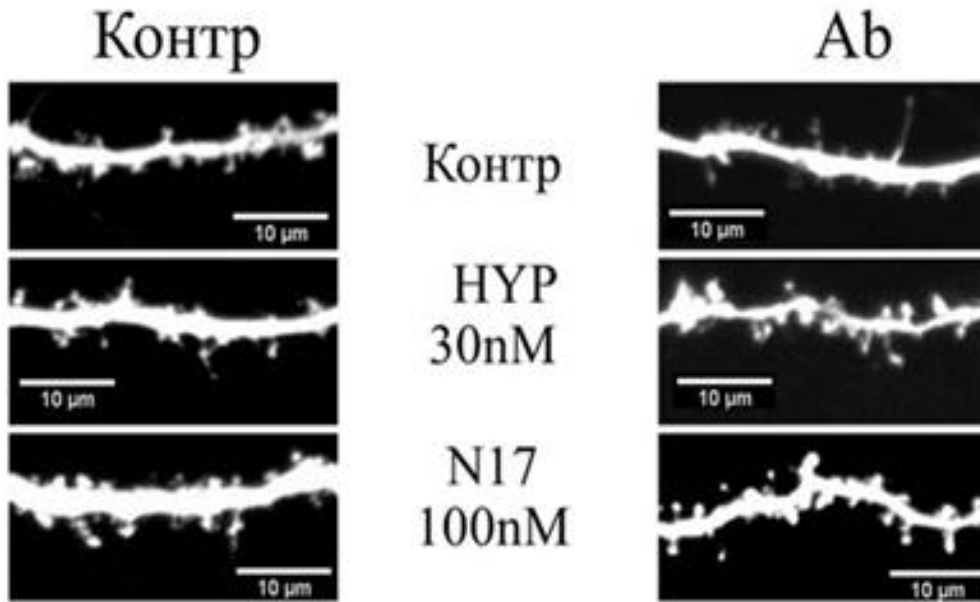
Исследование влияния ФДЭС на нейрональный депо-управляемый вход кальция (нДУВК)



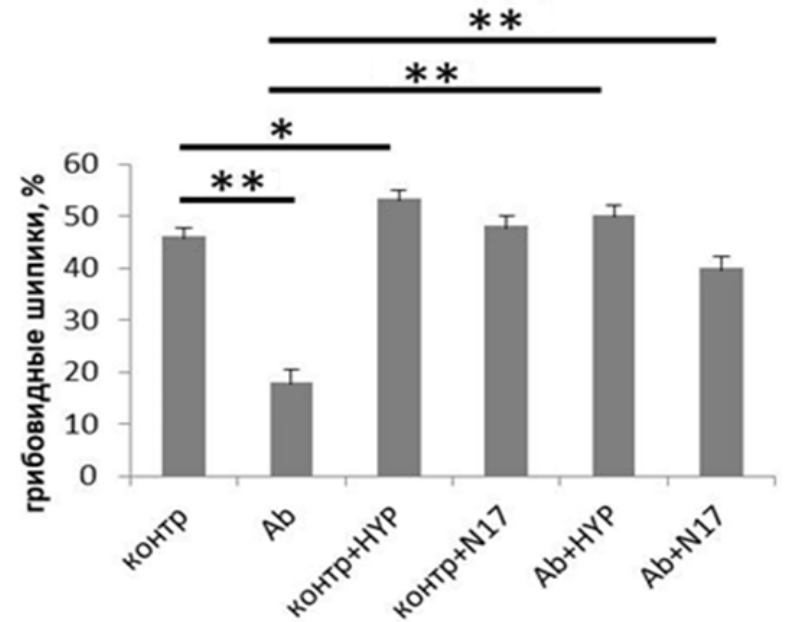
Изучение специфичности ФДЭС в активации TRPC6-нДУВК



Влияние ФДЭС на рост грибовидных шипиков в присутствии бета-амилоида

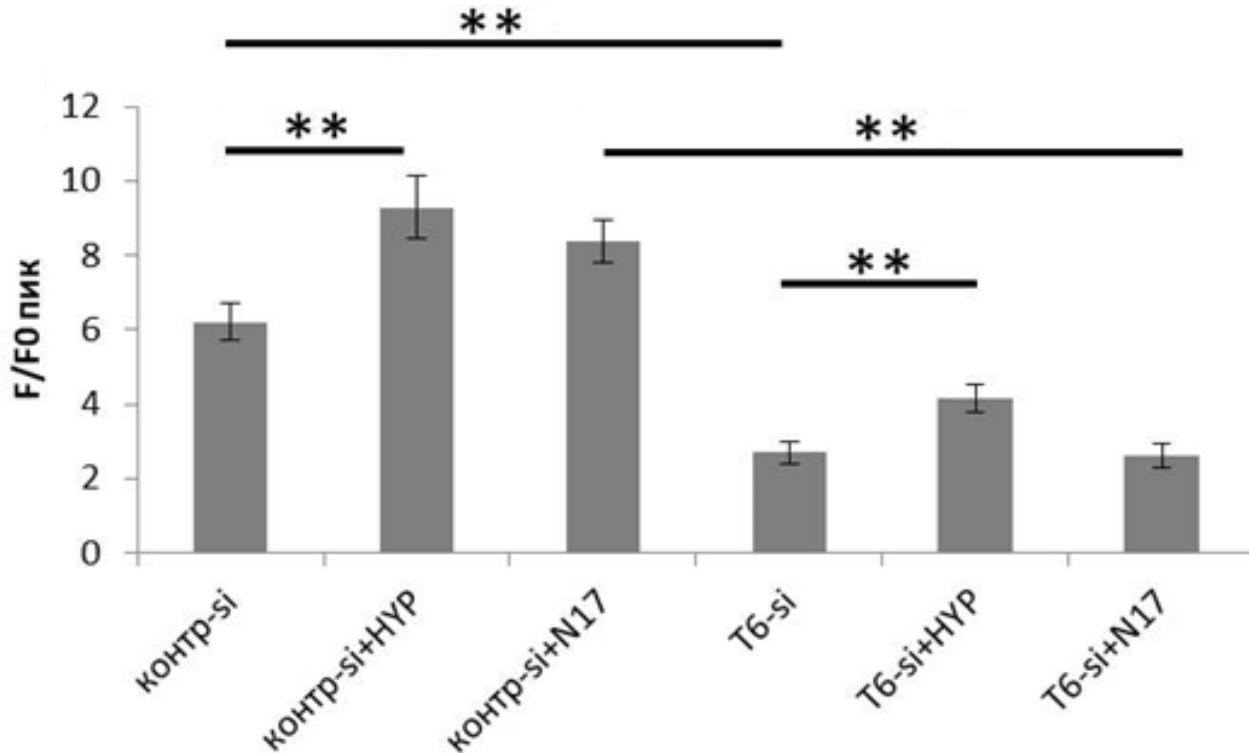


Репрезентативные микрофотографии каждой исследованной группы гиппокампальных нейронов трансфицированных плазмидой TD-Tomato.



В каждой группе было исследовано 30 ± 2 нейрона. Результаты представлены в виде $M \pm SE$. Контр – контрольная группа, Ab – бета-амилоид, HYP - гиперфорин, N17 – ФДЭС; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Крускала-Уоллиса

Влияние ФДЭС на активацию нДУВК



Результаты представлены в виде $M \pm SE$. Сокращения:

Контр-si контрольная группа нейронов, которая была трансфицирована siРНК некомплементарной ни к одной клеточной РНК;

T6-si - группа нейронов, трансфицированная siРНК комплементарной к РНК, кодирующей белок TRPC6;

НУР - гиперфорин;

N17 – ФДЭС;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по критерию Крускала-Уоллиса.

Роль рецепторных систем в реализации двигательной функции	Альфа-2 адренорецепторы	Холинергическая система
	<p>Модуляции кинематических и миографических параметров локомоции, а также рефлекторных вызванных потенциалов в мышцах задних конечностей.</p> <p>Наибольший вклад вносят альфа-2_c адренорецепторы .</p>	<p>Показано, что M1, M2, M3 и M4 XP играют важную роль в локомоторной функции.</p> <p>Jordan L.M. [и др.]. Cholinergic mechanisms in spinal locomotion potential target for rehabilitation approaches // Frontiers in Neural Circuits. 2014. (8).</p>
Механизм действия исследуемых соединений	Мафедин	ФДЭС
	Возбуждение альфа-2 _c адренорецепторов	Увеличение образования грибовидных шипиков за счет активации нДУВК, холинотропное действие
Ответ конечностей на тактильную и проприорецептивную стимуляцию	↑	↑
Общая двигательная активность	↑	↑
Координация движений передних и задних лап	↑	↑
Уменьшение объема повреждения головного мозга и интенсивности воспаления в области травмы	+	Без изменений

Спасибо за внимание!

Выводы

1) Альфа- 2_A , 2_B и 2_C адренорецепторы участвуют в модуляции кинематических и миографических параметров локомоции, а также рефлекторных вызванных потенциалов в мышцах задних конечностей. Двигательные эффекты селективных антагонистов данных рецепторов определяются их распределением в нейронных сетях спинного мозга и зависят от механизмов, изначально инициирующих шагательные движения: стимуляции спинного мозга, сенсорных путей и проприоспинальных связей.

2) Ключевую роль в нейроконтроле локомоции играют альфа- 2_C адренорецепторы. Их блокада приводит к ухудшению ходьбы по ряду кинематических параметров, снижению активности мышц-экстензоров, а также уменьшению амплитуды рефлекторных мышечных ответов при эпидуральной стимуляции спинного мозга.

Выводы

3) Мафедин является агонистом центральных альфа-2_c адренорецепторов. На модели зебраданио введение мафедина в дозе 60 мг/л приводит к достоверным изменениям двигательного-поведенческих параметров животных в тесте «Новый аквариум», устраняемым избирательным антагонистом альфа-2_c адренорецепторов.

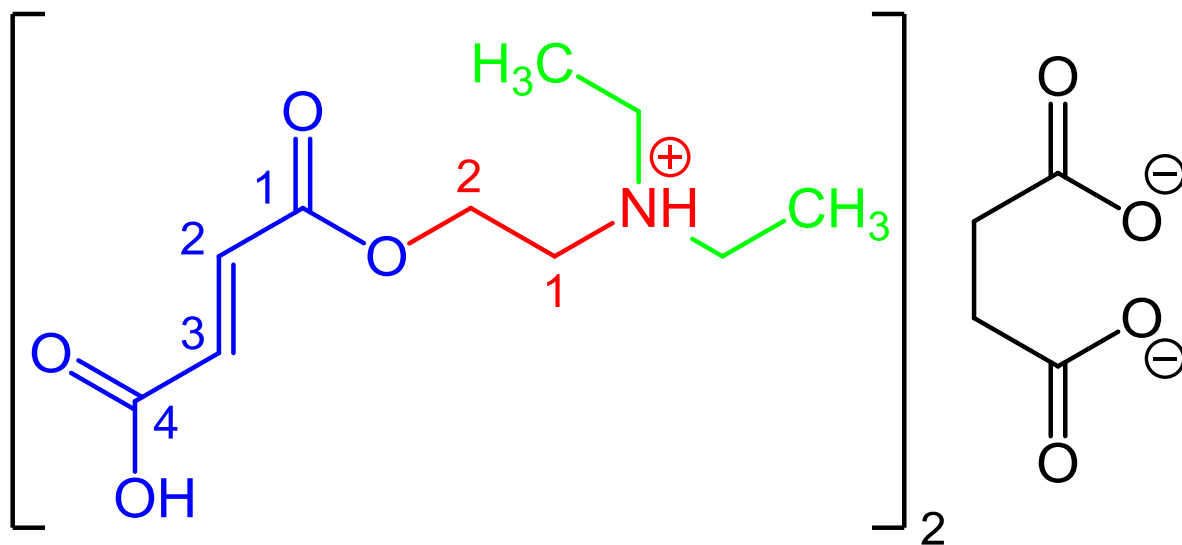
4) За счет активации TRPC6-зависимого нДУВК ФДЭС демонстрирует нейропротекторные свойства в первичной гиппокампальной культуре. Нейропротекторный эффект изучаемого соединения заключается в способности защищать грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности, тем самым стабилизируя и усиливая синаптическую передачу, при этом его рабочие концентрации находятся в наномолярном диапазоне.

Выводы

5) Введение мафедина крысам после черепно-мозговой травмы способствует снижению неврологического дефицита, увеличению общей двигательной активности и нормализации моторно-координационной функции контрлатеральных передних и задних конечностей. Данное соединение позволяет достичь уменьшения объема повреждения головного мозга, а также снижения интенсивности воспалительного процесса в очаге повреждения. Наибольшая нейрореабилитационная активность мафедина наблюдается в дозе 2,5 мг/кг, и сопоставима с таковой клонидина в дозе 40 мкг/кг.

6) ФДЭС способствует снижению неврологического дефицита и улучшению ориентировочно-исследовательского поведения у крыс на фоне черепно-мозговой травмы. Наибольшая эффективность нового соединения наблюдается при его введении в дозе 10 мг/кг. Нейропротекторная активность ФДЭС в этой дозе сопоставима с таковой цитиколина в дозе 500 мг/кг. Положительный эффект соединения реализуется за счет холинергических механизмов, поскольку скополамин в эквимольных количествах отменяет действие ФДЭС.

Особенности номенклатуры исследуемого соединения



Заместительная номенклатура ИЮПАК (соль аминия)^{1,2}:

2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия бутандиоат

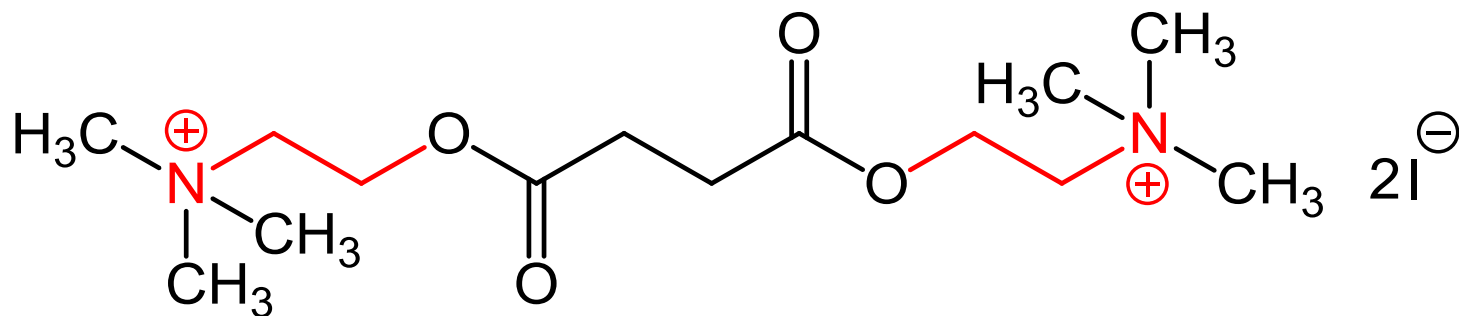
Радикально-функциональная номенклатура (соль аммония)²:

N-[2-(транс-3-карбоксиакрилоилокси)этил]-N,N-диэтиламмония сукцинат

¹ Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names / H.A. Favre, W.H. Powell // The Royal Society of Chemistry. – 2013. – 1568 p.

² Систематическая номенклатура органических соединений / Д. Хельвинкель // БИНОМ. Лаборатория знаний – 2017. – 232 с.

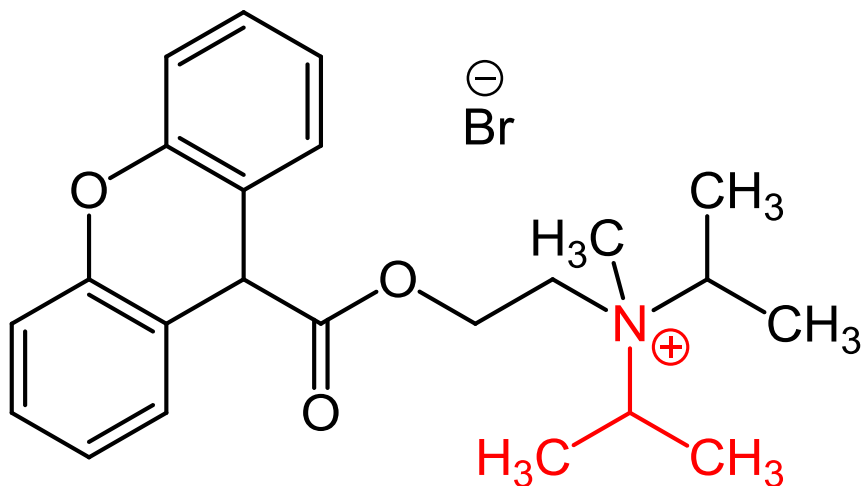
Примеры систематической номенклатуры среды лекарственных препаратов



Суксаметония иодид

Химическое название¹:

2,2'-[(1,4-Диоксо-1,4-бутандиил)бис(окси)]бис[N,N,N-триметилэтанаминия иодид



Пропантелина бромид

Химическое название¹:

N-Метил-N-(1-метилэтил)-N-{2-[9H-ксантен-9-илкарбонил)окси]этил} - пропан-2-аминия бромид

¹ Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств / под. ред. Г.Л. Вышковского // М.: РЛС+, 2009 г. – 1440 с.