

## ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАЛИЕВОЙ СОЛИ N-(4-АЦЕТОКСИБЕНЗОИЛ)ГЛИЦИНА У КРЫС

Е. В. Волотова, Д. В. Верхоляк, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин, А. К. Брель,  
С. В. Лисина, Ю. Н. Будаева, И. Н. Тюренков<sup>1</sup>

При моделировании необратимой двусторонней окклюзии общих сонных артерий у крыс калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина (соединение С40) оказала выраженное протекторное действие, увеличивая число выживших животных на 52 %, уменьшая у них неврологические отклонения, когнитивный дефицит, повышая уровень кровотока в проекции средней мозговой артерии на 77,5 % по сравнению с контролем, уменьшая отек головного мозга ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** 4-гидроксibenзойная кислота; глицин; ишемия головного мозга; нарушения мозгового кровообращения, крысы.

### ВВЕДЕНИЕ

Эффективность церебропротекторных средств включает способность нивелировать последствия, либо смягчать течение гипоксии головного мозга [8]. Это связано с тем, что расстройства системной гемодинамики, регионарного кровотока, микроциркуляции способствуют развитию гипоксии, изменениям качественного и количественного состава крови, активности ферментов тканевого дыхания [5]. Поэтому несомненный интерес представляют церебропротекторы, которые, с одной стороны, могут улучшать мозговой кровоток при его нарушении, а с другой — в условиях выраженной ишемии способны повышать жизнеспособность головного мозга, оказывая антигипоксическое действие, что делает их полезными в борьбе с ишемией и последствиями окислительного стресса.

В настоящее время актуальным является синтез веществ, состоящих из фрагментов, которые способны взаимодействовать с различными мишенями и обладать широким спектром фармакологических свойств. Примерами таких структур могут быть остатки гидроксибензойных кислот, аминокислотные остатки и фосфорорганические фрагменты [1].

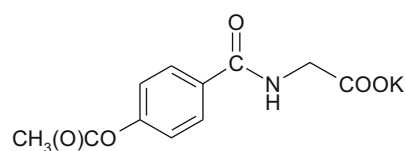
Производные гидроксибензойных кислот — одна из самых старых и широко известных групп фармакологических соединений, которые не только полностью сохранили свое значение как лекарственные средства, но и благодаря систематическому изучению особенностей их действия все шире используются в практической медицине и являются многообещающими в плане получения новых соединений — перспективных лекарственных препаратов с широким диапазоном терапевтического действия и низкой токсичностью. Например, N-(4-гидроксibenзоил)глицин и его производные демонстрируют различную биологическую активность: способность *in vivo* регулировать биосинтез  $\alpha$ -амидированных белковых гормонов, значительную

противовоспалительную активность и снижение апоптоза гранулоцитов. Указанные свойства позволяют отнести N-(4-гидроксibenзоил)глицин и его производные к потенциальным веществам, которые могут быть использованы для лечения различных заболеваний [1, 7, 12]. В этой связи на кафедре химии ВолгГМУ был синтезирован ряд ацетилированных производных N-(4-гидроксibenзоил)глицина, среди которых высокой церебропротекторной активностью отличалась калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина (соединение под лабораторным шифром С40) [2].

В данной работе представлены данные, отражающие церебропротекторные свойства калиевой соли N-(4-ацетоксибензоил)глицина — соединения С40 — при моделировании двусторонней необратимой окклюзии сонных артерий у крыс.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование церебропротекторной активности при ишемии головного мозга выполнено на 110 взрослых (6 – 7 мес) крысах-самцах массой 240 – 260 г. Все животные получены в одно время из питомника д. Рапполово Ленинградской области и содержались в стандартных условиях вивария с естественным светотемновым режимом без ограничения доступа к воде и пище. Оперативные вмешательства и эвтаназию животных с помощью гильотины проводили под общей анестезией (хлоралгидрат 400 мг/кг, внутривенно). Противоишемическое, церебропротекторное действие соединений и препаратов сравнения изучали при гипоксии головного мозга, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий (ОСА) [6], при



**Рис. 1.** Химическое строение соединения С40 (калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина).

<sup>1</sup> Волгоградский государственный медицинский университет, Россия, 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1.

этом регистрировали несколько показателей: выживаемость животных (%), возникающий неврологический дефицит (балл), который регистрировали через 6, 12, 24, 48 и 72 ч после ОСА по шкале McGraw, уровень двигательной (число пересеченных квадратов) и ориентировочно-исследовательской активности (сумма числа заглядываний в отверстия и вставаний на задние лапы) в тесте открытое поле (ОП), нарушения памяти в тесте условной реакции пассивного избегания (УРПИ) по изменению латентного периода (с) захода в темный отсек и числа заходов в него (n) и тесте экстраполяционного избегания (ТЭИ) по изменению латентного периода (с) решения экстраполяционной задачи. Уровень мозгового кровотока оценивали в бассейне средней мозговой артерии с помощью лазер-доплер флоуметра Biopac-systems MP-150 (США) [3, 10]. О наличии отека мозга, возникающего в результате ишемии, судили по количеству жидкости, содержащейся в ткани головного мозга. Для этого после проведения всех вышеописанных манипуляций и после эвтаназии извлекали головной мозг животного, взвешивали, сушили в термостате ( $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в течение 24 ч) и повторно взвешивали, при этом вычисляли коэффициент гидратации (КГ) мозговой ткани по формуле:  $\text{КГ} = (\text{Масса мозга до сушки} - \text{Масса мозга после сушки}) / \text{Масса мозга до сушки} \cdot 100\%$  [10].

Исследуемое соединение и препараты сравнения вводили дважды: внутривентриально за 30 мин до окклюзии общих сонных артерий и через 2 ч после нее. Животным групп ЛО и контроль-ишемия вводили эквивалентный объем 0,9 % раствора натрия хлорида по аналогичной схеме. Сформированы следующие группы животных: ЛО (ложнооперированные) — животные без ОСА, получавшие 0,9 % раствора натрия хлорида; контроль-ишемия — животные, получавшие 0,9 % раствора натрия хлорида при ОСА; опыт 1 — животные, получавшие соединение С40 в наиболее эффективной дозе 9 мг/кг [2]; опыт 2 — животные, получавшие мексидол (100 мг/кг); опыт 3 — животные, получавшие глицин (10 мг/кг). Каждая группа состоя-

ла из 20 крыс, за исключением группы контроль-ишемия, которая включала 30 животных.

В исследовании использованы животные с амбивалентным типом поведения, отобранные на основе фенотипирования по поведению в тесте ОП. Животных с высокой и низкой поведенческой активностью не отбирали в эксперимент.

При проведении работы руководствовались “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”. Все исследования одобрены Региональным исследовательским этическим комитетом при ГУ “ВМНЦ”.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 5 [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Церебропротекторные свойства соединения С40.** Перевязка ОСА вызывает каскад патофизиологических и патобиохимических процессов в мозговой ткани, которые, в свою очередь, приводят к неврологическим нарушениям и дефициту когнитивных функций, причем характер и степень этих нарушений неизбежно коррелирует с локализацией, размером и продолжительностью ишемии [4].

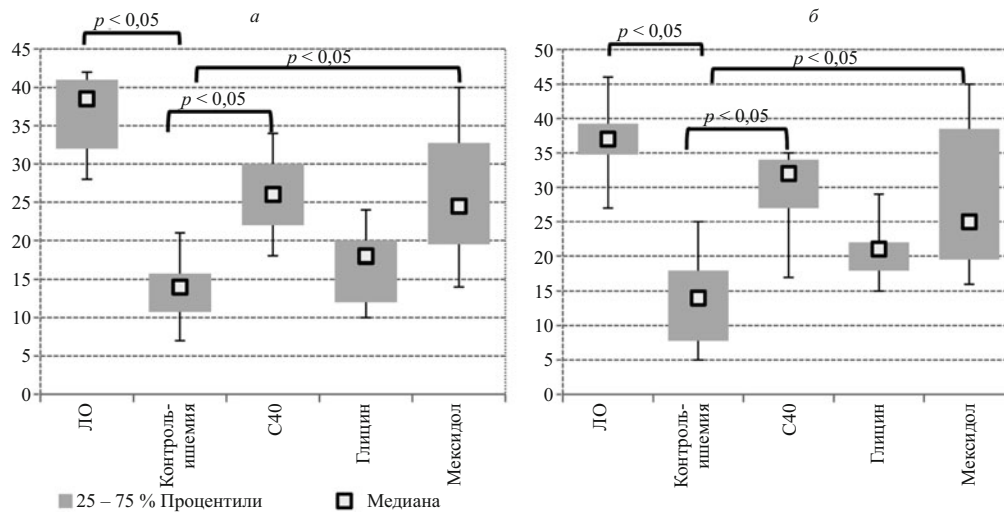
Моделирование церебральной ишемии у крыс путем билатеральной окклюзии сонных артерий приводило к гибели части животных (табл. 1), которая была максимальна в группе контроль-ишемия. Первые смертельные исходы наблюдали уже через 6 ч после моделирования патологии, однако большинство животных погибло к концу первых суток (43 %). В ходе дальнейшего наблюдения число летальных исходов продолжало увеличиваться и через 72 ч после операции достигло 67 %.

Исследуемое соединение С40 уменьшало количество летальных исходов после ОСА. Первый летальный исход в данной группе зафиксирован по окончании первых суток, к 72 ч наблюдения погибло лишь 15 % животных, что достоверно ниже, по сравнению с груп-

Таблица 1. Влияние С40 и препаратов сравнения на летальность животных при необратимой билатеральной окклюзии ОСА

Группа животных/число животных (N)	Летальность животных после ОСА					шанс выживаемости
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч	
	%	%	%	%	%	
ЛО	0	0	0	0	0	-
Контроль-ишемия	7	30*	43*	53*	67*	-
С40	0	0^	5^#	10^#	15^#	12,9 ± 0,7 $p < 0,01$
Мексидол	0	5	15	15	20^	10,5 ± 0,7 $p < 0,01$
Глицин	20	20	40*	45*	55*	0,61 ± 0,7 $p > 0,05$

\* Различия достоверны, по сравнению с ЛО группой ( $p < 0,05$ ); ^ с группой контроль-ишемия; # с группой, получавшей глицин ( $p < 0,05$ , критерий Фишера).



**Рис. 2.** Влияние С40 и препаратов сравнения на двигательную (а) и ориентировочно-исследовательскую (б) активность животных с церебральной ишемией головного мозга в тесте ОП.

Здесь и на рис. 3 – 5 по оси ординат — число пересеченных квадратов (а) или число заглядываний в отверстия и вставаний на задние лапы (б).

пой контроль-ишемия, так и с группой животных, которые получали препарат сравнения глицин.

Неврологический дефицит высокой тяжести у животных контрольной группы проявлялся в виде вялости, заторможенности, манежности движений, наличия парезов, параличей конечностей, возникновения одно- и двустороннего блефароптоза, снижения мышечного тонуса. При этом по состоянию на первые сутки после операции неврологический дефицит животных всех экспериментальных групп (за исключением группы ЛО животных) был сопоставим. Однако неврологический дефицит животных контрольной группы на протяжении всего периода наблюдения так и оставался на высоком уровне (8,6 – 9,4 балла).

Исследуемое соединение и препараты сравнения в разной степени снижали неврологический дефицит после ОСА (табл. 2).

Так, по результатам подсчета индекса McGraw, положительная динамика наблюдалась в группах, получавших соединение С40 (достоверно относительно контроля при  $p < 0,05$ ) и препарат сравнения мексидол. В группе, получавшей глицин, степень неврологического дефицита не снизилась и оставалась на уровне 8,1 балла.

Комплексное изучение неврологических симптомов при заболеваниях ЦНС различной этиологии предполагает оценку поведенческих отклонений, анализ которых позволяет судить о тяжести поражения головного мозга. Исследование нарушений поведенческих, а также когнитивных функций животных, проводилось через 72 ч после перевязки сонных артерий с использованием стандартных психофармакологических тестов ОП, УРПИ и ТЭИ.

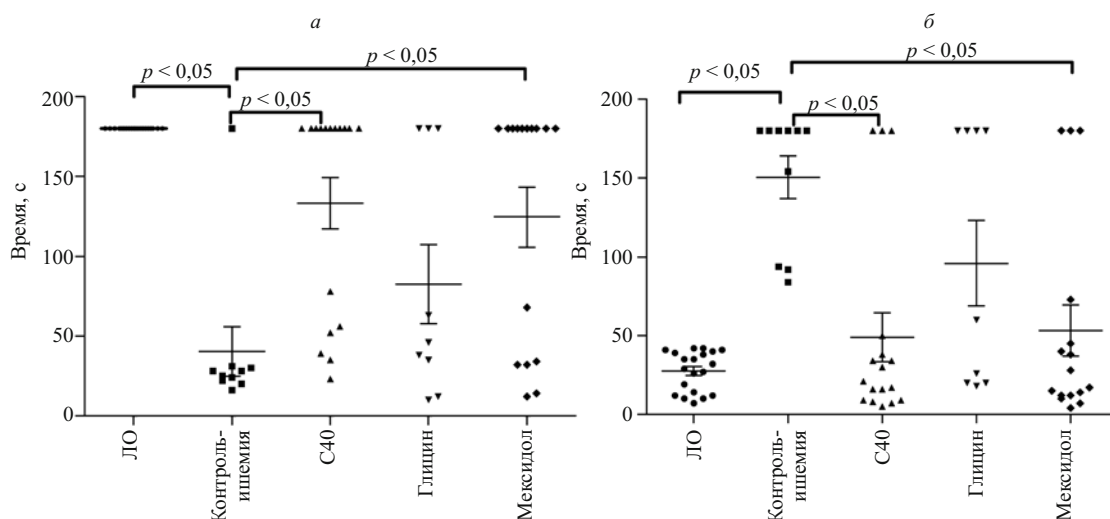
Двигательная активность животных всех исследуемых групп в тесте “ОП” была снижена относительно ЛО животных (рис. 2). Так в группе контрольных животных двигательная активность через 72 ч после создания ишемии была статистически значимо ниже в 2,6 раза, чем в группе ЛО животных ( $p < 0,05$ ). У животных, получавших исследуемое соединение и препарат сравнения мексидол, показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности ишемизированных животных были выше, чем в контроле (рис. 2).

Тесты УРПИ и ТЭИ традиционно применяются для изучения когнитивных функций животных при оценке действия исследуемых веществ и выявления повреждений ЦНС. При этом изучается формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа животны-

**Таблица 2.** Выраженность неврологического дефицита по шкале McGraw (в баллах) животных после необратимой окклюзии сонных артерий (ОСА) на фоне введения С40 и препаратов сравнения ( $M \pm m$ )

Группа животных	Время после необратимой ОСА				
	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль-ишемия	8,6 ± 0,2	8,6 ± 0,3	9,3 ± 0,1	9,4 ± 0,1	9,4 ± 0,2
С40	7,1 ± 0,2 <sup>#</sup>	6,5 ± 0,2 <sup>#</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>#</sup>	6 ± 0,4 <sup>#</sup>	5,3 ± 0,6 <sup>#</sup>
Мексидол	7,3 ± 0,4 <sup>#</sup>	6,9 ± 0,4	6,6 ± 0,4 <sup>#</sup>	6,3 ± 0,5 <sup>#</sup>	6,1 ± 0,6 <sup>#</sup>
Глицин	8,6 ± 0,3	8,8 ± 0,3	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,1 ± 0,5

<sup>#</sup> Различия достоверны по критерию Данна в сравнении с группой контроль-ишемия ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Влияние С40 и препаратов сравнения на латентный период (с) захода крыс в темный отсек в тесте “УРПИ” (а) и решения экстраполяционной задачи (с) в тесте “ТЭИ” (б) при воспроизведении через 72 ч после ОСА.

ми, в данном случае после ишемии головного мозга. Обучение животных было проведено до двусторонней окклюзии ОСА, контроль усвоения и сформированности навыка решения задачи экстраполяции и выработки рефлекса пассивного избегания животными проводили через 24 ч после обучения, а повторный контроль проводили через 72 ч после окклюзии ОСА с целью выявления степени нарушения когнитивной функции. При выполнении и анализе результатов обоих тестов в группах наблюдали схожие тенденции изменения параметров с незначительной вариабельностью.

Вызванная окклюзией ОСА ишемия головного мозга приводила к возникновению явлений амнезии, что проявлялось в уменьшении латентного периода захода в темный отсек в тесте УРПИ, увеличении латентного периода решения экстраполяционной задачи в ТЭИ и в увеличении числа животных, не выполнивших задачи экстраполяционного извлечения (рис. 3).

При анализе сохранности мнестической функции оперированных животных, получавших исследуемое соединение С40, в тех же тестах (ТЭИ и УРПИ) выявлено лучшее сохранение следа памяти по отношению к группе ишемизированного контроля, что выражалось в достоверном снижении латентного периода решения экстраполяционной задачи и увеличении латентного времени захода в темный отсек в УРПИ. Его эффект был сопоставим с таковым у препарата сравнения мексидола.

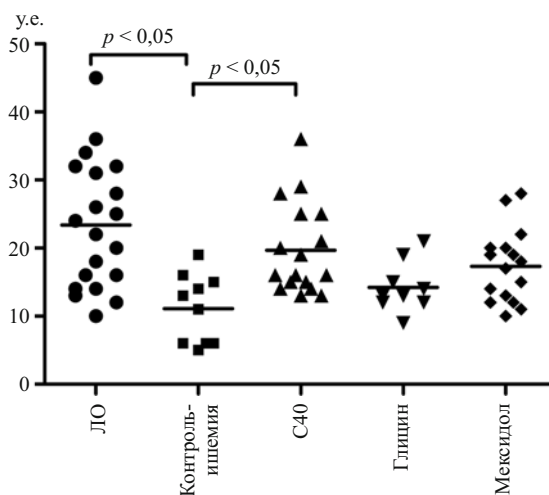
**Влияние соединения С40 на мозговой кровоток**

Снижение уровня мозгового кровотока является иницирующим фактором в запуске цепи патологических процессов, приводящих к ишемическому поражению мозговой ткани и, как следствие, развитию более выраженных неврологических, поведенческих и когнитивных нарушений в дальнейшем. В этой связи произведена регистрация уровня мозгового кровотока у животных, получавших исследуемое соединение до и

после ОСА. Уровень мозгового кровотока контрольной группы животных в момент регистрации был достоверно (более чем в 2 раза) ниже, чем в группе ЛО животных ( $p < 0,05$ ).

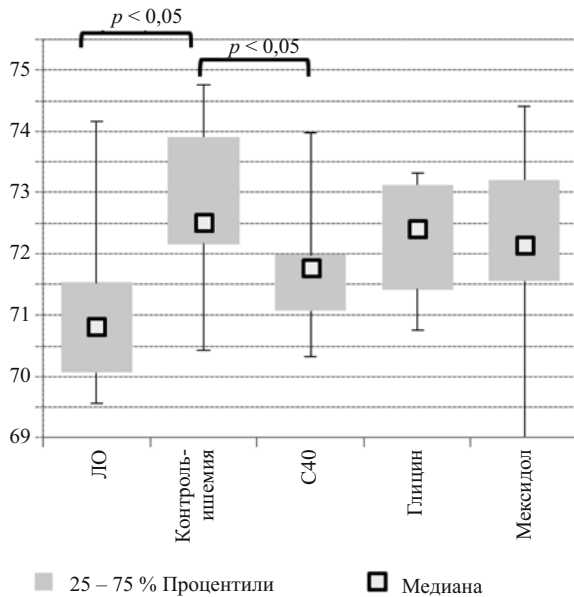
В группах животных, получавших исследуемое соединение С40, мозговой кровоток был значительно выше относительно наблюдаемого у животных в группах контроль-ишемия и получавших препараты сравнения мексидол и глицин (рис. 4).

Снижение уровня мозгового кровотока приводит к ишемии и всегда к нарушению функционирования эндотелиальных клеток, а это, в свою очередь, приводит вначале к возникновению, а потом и к нарастанию цитотоксического отёка мозговой ткани [11]. Количественная оценка содержания жидкости в мозговой ткани даёт возможность оценить этапность патобиохимических реакций ишемии и наличие в ней структурных изменений.



**Рис. 4.** Влияние С40 и препаратов сравнения на уровень мозгового кровотока (у. е.) в бассейне средней мозговой артерии крыс после необратимой ОСА.





**Рис. 5.** Влияние С40 и препаратов сравнения на процент гидратации мозговой ткани крыс после перенесённой ишемии головного мозга.

Определение гидратации мозга через 72 ч после ОСА показало, что у животных контрольной группы отмечался выраженный отек головного мозга. Соединение С40 статистически значимо уменьшало отек. У препаратов мексидол и глицин этот эффект был не выражен (рис. 5).

Таким образом, калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина (соединение С40) после ОСА повышала выживаемость, а у выживших животных наблюдали меньшие неврологические нарушения, чем в контрольной группе и у животных, получавших препараты сравнения мексидол и глицин. Через 3 сут после перевязки ОСА, животные, получавшие С40, были более подвижны, у них менее выражена постишемическая амнезия. Очевидно, что церебропротекторное действие соединения С40 связано с улучшением мозгового кровообращения и снижением выраженности постишемического отека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Калиевая соль N-(4-ацетоксибензоил)глицина (соединение С40) в дозе 9 мг/кг, внутривенно за

30 мин до окклюзии общих сонных артерий и через 2 ч после нее оказывает выраженное церебропротекторное действие у крыс при ишемии головного мозга, вызванной необратимой окклюзией ОСА, достоверно увеличивая число выживших животных к 72 ч после операции, шанс выживаемости ( $12,9 \pm 0,7$ ), уменьшая выраженность неврологических и когнитивных нарушений, повышая уровень мозгового кровотока (на 77,5 % по сравнению с контролем), уменьшая постишемический отек мозговой ткани,  $p < 0,05$ . Оказываемое протекторное действие калиевой соли N-(4-ацетоксибензоил)глицина превосходит таковое препарата глицина,  $p < 0,05$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. К. Брель, С. В. Лисина, Ю. Н. Будаева, *Ж. общей химии*, № 2, 213 – 218 (2015).
2. А. К. Брель, И. Н. Тюренков, С. В. Лисина и др., Патент РФ № 2556637 RU, *Бюл. изобрет.*, № 19 (2015).
3. Е. В. Волотова, Д. В. Куркин, Н. В. Мазина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(6), 11 – 13 (2013).
4. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
5. Л. Д. Лукьянова, *Патогенез*, № 3, 4 – 12 (2008).
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов (ред.), Часть первая, Гриф и К, Москва, (2012).
7. Е. И. Морковин, А. С. Тарасов, Я. В. Самсоник, И. А. Мягкова, *Проблемы фармацевтической науки и практики: Материалы IV Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием*, Владикавказ (2014), сс. 210 – 213.
8. В. Е. Новиков, Н. П. Катунина, *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии*, **1**(2), 73 – 87 (2002).
9. А. С. Тарасов, В. В. Степанова, Е. И. Морковин, *Вестник Волгоград. гос. мед. универ.*, **56**(4), 110 – 111 (2015).
10. И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **71**(1), 49 – 51 (2008).
11. В. В. Яснецов, В. Е. Новиков, *Фармакотерапия отека головного мозга*, ВИНТИ, Москва (1994).
12. Е. И. Morkovin, A. S. Tarasov, Y. V. Samsonik, I. A. Myagkova, *The First European Conference on Biology and Medical Sciences*, Vienna (2014), pp. 181 – 184.

Поступила 15.12.16

## CEREBROPROTECTIVE EFFECTS OF N-(4-ACETOXYBENZOYL)GLYCINE POTASSIUM SALT IN RATS WITH PERMANENT BILATERAL COMMON ARTERY OCCLUSION

E. V. Volotova, D. V. Verkholyak, D. V. Kurkin, D. A. Bakulin, A. K. Brel', S. V. Lisina, Yu. N. Budaeva, and I. N. Tyurenkov

Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

Potassium salt of N-(4-acetoxybenzoil)glycine (compound C40) exhibited protective effects manifested by 52% increased survival rate, decreased neurological impairments and cognitive deficiency, 77.5% increased blood flow in middle-cerebral artery area, and decreased brain edema in comparison to control ( $p < 0.005$ ) in rats with bilateral common carotid artery occlusion.

**Keywords:** 4-hydroxybenzoic acid; glycine; brain ischemia; cerebrovascular circulation; rats.