

# ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

## ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ОКСИПИРИДИНА И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ОСТРОЙ АЛЛОКСАНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У МЫШЕЙ

И. А. Волчегорский, И. Ю. Мирошниченко, Л. М. Рассохина, М. П. Малкин,  
Р. М. Файзуллин, К. Е. Пряхина, А. В. Калугина<sup>1</sup>

Изучено протекторное действие оригинальных отечественных производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты (эмоксипина, реамберина и мексидола) при острой аллоксановой интоксикации у мышей. Установлено, что все изученные производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты оказывают протекторное действие в отношении аллоксан-индуцированной гипергликемии, сопутствующего увеличения длительности «поведения отчаяния» мышей в тесте подвешивания за хвост и снижения активности животных в «открытом поле». Показано, что наиболее выраженным протекторным действием при острой аллоксановой интоксикации обладает мексидол, который превосходит эмоксипин по дозовой распространенности эффекта уменьшения аллоксановой гипергликемии, и реамберин по способности предотвращать аллоксан-индуцированный прирост «поведения отчаяния».

**Ключевые слова:** производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты; острая аллоксановая интоксикация

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие сахарного диабета (СД) связано с прогрессирующей деструкцией панкреатических  $\beta$ -эндокриноцитов и нарастающим дефицитом секреции инсулина. В первую очередь это касается СД 1 типа (СД1), обусловленного аутоиммунным инсулитом с быстрым развитием абсолютной недостаточности инсулина. Длительное течение СД 2 типа (СД2) связано со вторичным, медленно прогрессирующим поражением  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и постепенным уменьшением изначально повышенной продукции инсулина. В конечном итоге это приводит к развитию инсулинопотребного подтипа СД2, при котором функциональную недостаточность  $\beta$ -эндокриноцитов компенсируют введением препаратов инсулина. Не взирая на общеизвестные различия механизмов инсулярного повреждения при СД1 и СД2, альтерация  $\beta$ -клеток островков Лангерганса всегда связана с локальным развитием окислительного стресса (ОС) [12]. Для воспроизведения данного феномена в эксперименте рекомендуется использовать аллоксан, рассматривающийся как “токсикант выбора” при моделировании ОС-индуцированной деструкции  $\beta$ -эндокриноцитов с последующим развитием аллоксанового диабета [14]. С целью фармакологической коррекции ОС-зависимых механизмов патогенеза СД и его осложнений широко используются лекарственные средства (ЛС), обладающие антиоксидантной активностью [1]. К числу подобных ЛС относятся отечественные производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты (эмоксипин, реамберин и мексидол), которые препятствуют поражению церебральных структур при аллоксановом

диабете в зависимости от ОС-модулирующей активности соответствующих препаратов [4]. Статья посвящена анализу влияния эмоксипина, реамберина и мексидола на проявления острой аллоксановой интоксикации у мышей. Эффективность производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты была сопоставлена с результатами применения  $\alpha$ -липоевой кислоты ( $\alpha$ -ЛК), которая рассматривается в качестве эффективного антиоксиданта, обладает гипогликемическим действием и считается эталонным средством лечения диабетических нейропатий [10].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 207 половозрелых нелинейных мышах обоего пола, массой 18 – 25 г. Организация работы соответствовала международным этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных [9]. Острую аллоксановую интоксикацию (ОАИ) вызывали однократным подкожным введением растворенного в 0,9 % NaCl аллоксана моногидрата (ДИА<sup>М</sup>, Россия) в дозе 245 мг/кг. Сразу после подкожной инъекции аллоксана животным однократно внутривентриально вводили препараты изучаемых ЛС. Каждый препарат применяли в 3 дозах, экстраполированных из разовых доз терапевтического диапазона для человека с учётом различий в величинах относительной площади поверхности тела [3]. Во всех случаях минимальной дозой изучаемого диапазона являлась 1/2 от расчетного эквивалента средней терапевтической дозы (ЭСТД). В качестве максимальной дозы использовали удвоенный ЭСТД.  $\alpha$ -ЛК (берлитион 300, Берлин-Хеми/ Менарини Фарма ГмбХ, Германия) вводили в дозах 25, 50 и 100 мг/кг. Эмоксипин (2-этил-6-метил-3-оксипиридина гидрохлорид, ФГУП “Московский эндокринный завод”) использовали в дозах 6,25; 12,5 и 25 мг/кг. Исследованные дозы 1,5 % раствора реамберина (N-(1-дезоксиде-D-глюцитол-1-ил)-N-метилам-

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. И. А. Волчегорский) ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64.

Таблица 1. Влияние производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на выраженность гипергликемии и расстройства поведения при острой аллоксановой интоксикации у мышей ( $M \pm m$ )

Показатель	Глюкоза, ммоль/л	“Открытое поле”			Длительность “поведения отчаяния”, с
		Горизонтальная активность (смена секторов)	Ориентировочная активность (вертикальные стойки)	Исследовательская активность (выглядывания через отверстия)	
Интактный контроль ( $n = 13$ )	$6,45 \pm 0,26$	$68,23 \pm 8,09$	$19,85 \pm 2,00$	$23,54 \pm 2,62$	$178,77 \pm 6,30$
Острая аллоксановая интоксикация (контроль, 245 мг/кг, $n = 12$ )	$25,72 \pm 2,15^*$	$25,00 \pm 4,57^*$	$7,08 \pm 1,25^*$	$5,83 \pm 1,39^*$	$233,33 \pm 10,97^*$
Эмоксипин 1/2 ЭСТД (12,5 мг/кг, $n = 12$ )	$18,15 \pm 2,40$	$62,42 \pm 6,71^{**}$	$14,50 \pm 2,76^{**}$	$16,17 \pm 2,74^{**}$	$146,67 \pm 17,25^{**}$
ЭСТД (25 мг/кг, $n = 11$ )	$9,66 \pm 1,30^{**}$	$70,36 \pm 9,58^{**}$	$21,91 \pm 4,73^{**}$	$23,82 \pm 3,94^{**}$	$120,18 \pm 15,86^{**}$
2 ЭСТД (50 мг/кг, $n = 11$ )	$9,78 \pm 1,16^{**}$	$70,64 \pm 6,93^{**}$	$16,00 \pm 3,31^{**}$	$21,45 \pm 2,94^{**}$	$118,55 \pm 17,75^{**}$
Реамберин 1/2 ЭСТД (25 мл/кг, $n = 11$ )	$12,03 \pm 1,88^{**}$	$58,36 \pm 8,66^{**}$	$20,82 \pm 4,17^{**}$	$19,91 \pm 4,46^{**}$	$126,64 \pm 11,92^{**}$
ЭСТД (50 мл/кг, $n = 12$ )	$12,48 \pm 2,47^{**}$	$89,75 \pm 7,52^{**}$	$21,00 \pm 2,31^{**}$	$23,92 \pm 3,24^{**}$	$149,83 \pm 9,15^{**}$
2 ЭСТД (100 мл/кг, $n = 13$ )	$6,21 \pm 0,41^{**}$	$79,00 \pm 10,22^{**}$	$17,77 \pm 2,94^{**}$	$16,38 \pm 3,35^{**}$	$148,85 \pm 18,04^{**}$
Мексидол 1/2 ЭСТД (25 мг/кг, $n = 12$ )	$17,13 \pm 2,21^{**}$	$78,58 \pm 4,55^{**}$	$21,83 \pm 4,85^{**}$	$25,33 \pm 2,77^{**}$	$151,92 \pm 15,49^{**}$
ЭСТД (50 мг/кг, $n = 12$ )	$10,13 \pm 1,58^{**}$	$93,50 \pm 8,58^{**}$	$21,67 \pm 3,68^{**}$	$29,17 \pm 3,66^{**}$	$91,50 \pm 13,53^{**}$
2 ЭСТД (100 мг/кг, $n = 11$ )	$13,66 \pm 3,02^{**}$	$73,73 \pm 7,18^{**}$	$18,09 \pm 3,80^{**}$	$23,45 \pm 4,31^{**}$	$110,45 \pm 17,66^{**}$

**Примечание.** Представлены результаты регистрации числа актов поведенческой активности, полученные в результате 5-минутного наблюдения за животными в “открытом поле”, и длительности поведения отчаяния в 6-минутном тесте подвешивания за хвост. \* — различия достоверны между группами “интактный контроль” и “острая аллоксановая интоксикация (контроль)” ( $p < 0,05$ ; по U-критерию Манна-Уитни); \*\* — различия достоверны между группой “острая аллоксановая интоксикация (контроль)” и группами, где применялись изучаемые лекарственные средства ( $p < 0,05$ ; по U-критерию Манна-Уитни).

мония натрия сукцинат, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург) составили 12,5; 25 и 50 мл/кг. Мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат, ООО “НПК “Фармасофт”, Москва) применяли в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг. Животные группы “контроль ОАИ” вместо исследованных ЛС получали эквивалентное количество 0,9 % раствора NaCl. Мышам группы “интактный контроль” вместо аллоксана и изученных ЛС вводили 0,9 % раствора NaCl в соответствующих объемах.

ОАИ-модулирующее действие изученных препаратов оценивали через 72 ч после введения аллоксана. Выбор данного срока обусловлен 4-фазным характером токсикодинамики аллоксана, вызывающего некротическую деструкцию  $\beta$ -эндокриноцитов и абсолютный дефицит инсулина в пределах 12 – 48 ч после введения [14]. Для надежного воспроизведения ОАИ период, предшествующий регистрации её проявлений, удлиняли на сутки от максимального времени развития абсолютного дефицита инсулина. Выраженность ОАИ оценивали по показателям летальности, снижению активности животных в “открытом поле” [3] и нарастанию длительности “поведения отчаяния” в 6-минутном тесте подвешивания за хвост [11]. Затем животных декапитировали и получали кровь для оценки гликемии. За сутки до эксперимента мышам лишали пищи при сохранении свободного доступа к воде.

Статистический анализ выполняли с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS-13.0. Показатели летальности при ОАИ представлены абсолютным количеством и процентной долей погибших животных в каждой группе. Значимость межгрупповых различий по летальности оценивали с помощью точного критерия Фишера. Остальные данные обработаны методами описательной статистики и представлены в виде средней арифметической и её стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). О достоверности соответствующих межгрупповых различий судили по U-критерию Манна-Уитни. Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости  $p = 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что через 72 ч после однократного подкожного введения аллоксана у мышей развивались отчетливые признаки ОАИ. Это проявилось гибелью 1/3 мышей в группе “контроль ОАИ” и практически 4-х кратным нарастанием гликемии у выживших животных (табл. 1 и 2). Выраженная гипергликемия у мышей группы “контроль ОАИ” сопровождалась значительным снижением активности животных в “открытом поле” и существенным нарастанием длительности “поведения отчаяния” в тесте подвешивания за хвост (табл. 1). Полученные данные соответствуют представлениям об аллоксановом пораже-

Таблица 2. Влияние эмоксипина, реамберина, мексидола и  $\alpha$ -липовой кислоты на летальность мышей при острой аллоксановой интоксикации

Показатель	Общее количество животных в группе	Количество и относительное число погибших животных (%)	<i>P</i>
Интактный контроль	13	0 (0)	
Острая аллоксановая интоксикация (контроль)	18	6 (33,33)	0,028
<i>Эмоксипин</i>			
1/2 ЭСТД (12,5 мг/кг)	14	2 (14,28)	0,412
ЭСТД (25 мг/кг)	13	2 (15,38)	0,412
2 ЭСТД (50 мг/кг)	15	4 (26,67)	0,722
<i>Реамберин</i>			
1/2 ЭСТД (25 мг/кг)	15	4 (26,67)	0,722
ЭСТД (50 мг/кг)	14	2 (14,28)	0,412
2 ЭСТД (100 мг/кг)	17	4 (23,53)	0,711
<i>Мексидол</i>			
1/2 ЭСТД (25 мг/кг)	14	2 (14,28)	0,412
ЭСТД (50 мг/кг)	14	2 (14,28)	0,412
2 ЭСТД (100 мг/кг)	15	4 (26,67)	0,722
<i><math>\alpha</math>-Липовая кислота</i>			
1/2 ЭСТД (50 мг/кг)	15	11 (73,33)	0,037
ЭСТД (100 мг/кг)	15	13 (86,67)	0,004
2 ЭСТД (200 мг/кг)	15	15 (100)	$\leq 0,001$

**Примечание.** Лекарственные средства вводили однократно внутрибрюшинно непосредственно после подкожной инъекции аллоксана; летальность мышей регистрировали в течение 72 ч после затравки аллоксаном; животным группы “интактный контроль” вместо аллоксана вводили эквивалентное количество 0,9 % раствора NaCl, животным группы “интактный контроль” и “острая аллоксановая интоксикация (контроль)” вместо изучаемых лекарственных средств вводили эквивалентное количество 0,9 % раствора NaCl; значимость межгрупповых различий по летальности оценивали с помощью точного критерия Фишера.

нии панкреатических  $\beta$ -эндокриноцитов с формированием абсолютного дефицита инсулина и последующим развитием гипергликемии [14]. Не исключено, что ОАИ-ассоциированные расстройства мотивированного поведения мышей развиваются в связи с сопутствующим аллоксановым повреждением гепатоцитов, которые, также как  $\beta$ -клетки островков Лангерганса, экспрессируют афинный к аллоксану транспортер глюкозы GLUT-2 [14]. Такая возможность иллюстрируется данными об аллоксан-индуцированном воспалительном поражении печени [2], вызывающем депрессивные расстройства поведения животных в рамках неспецифического феномена “поведения болезни” (sickness behaviour) [13]. Не исключено также, что ОАИ-ассоциированное “поведение болезни” в определенной степени может быть связано и с GLUT-2-опосредованным аллоксановым поражением почек [14].

Производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты, вводимые сразу после инъекции аллоксана, вызвали незначительную тенденцию к снижению летальности (табл. 2) и существенно уменьшили остальные проявления ОАИ. В первую очередь это проявилось достоверным снижением

выраженности гипергликемии. Как видно (табл. 1), сукцинат-содержащие ЛС (реамберин и мексидол) препятствовали развитию ОАИ-ассоциированной гипергликемии во всем диапазоне изученных доз, а изолированное производное 3-оксипиридина (эмоксипин) оказывало такое действие только в относительно высоких дозах (ЭСТД и 2ЭСТД). Самое выраженное протекторное действие в отношении аллоксановой гипергликемии было отмечено при введении максимальной дозы реамберина (2 ЭСТД), которая уменьшала концентрацию глюкозы в крови животных с ОАИ до уровня группы “интактный контроль” (табл. 1).

Уменьшение выраженности аллоксан-индуцированной гипергликемии под действием производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты сопровождалось снижением признаков ОАИ-ассоциированного “поведения болезни” во всем диапазоне изученных доз (табл. 1). Это проявилось предотвращением снижения поведенческой активности животных в “открытом поле” и нормализацией длительности “поведения отчаяния”. Прежде всего, данная закономерность касалась “поведения отчаяния”, средняя продолжительность которого под действием большинства доз эмоксипина, реамберина и мексидола оказалась ниже не только значений “контроля ОАИ” (табл. 1), но и “интактного контроля” ( $p < 0,001 - 0,029$ ). Исключение составили минимальные дозы производных 3-оксипиридина (эмоксипина и мексидола) и максимальная доза реамберина, которые уменьшали длительность иммобильности в 6-минутном тесте подвешивания за хвост только в сравнении с группой “контроль ОАИ”.

Обсуждаемые проявления ОАИ-протекторного действия особенно ярко проявились при использовании мексидола в средней дозировке. Как видно (табл. 1), ЭСТД мексидола не только полностью предотвращал аллоксан-индуцированное снижение горизонтальной активности мышей в “открытом поле”, но даже увеличивал соответствующий параметр относительно значений “интактного контроля” ( $p = 0,041$ ). Стоит добавить, что мексидол, вводимый в средней дозе, сокращал “поведение отчаяния” не только в сравнении с “контролем ОАИ” и “интактным контролем”, но и относительно группы “реамберин” ( $p = 0,007$ ). Данный факт свидетельствует о более выраженном ОАИ-протекторном эффекте мексидола, в сравнении с реамберинем. Стоит добавить, что способность реамберина к уменьшению токсических эффектов аллоксана прямо зависит от тяжести ОАИ. Об этом свидетельствуют результаты предыдущего исследования [5], в котором выраженность проявлений ОАИ была заметно ниже, чем в данной работе. На этом фоне реамберин оказал протекторное действие только в отношении снижения вертикальной активности в “открытом поле” и вызвал лишь незначимые тенденции к сокращению “поведения отчаяния” и уменьшению гипергликемии.

Полученные данные позволяют считать, что мексидол обладает наиболее выраженной ОАИ-протекторной активностью среди изученных производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты. Об этом свидетельствует преимущество мексидола над эмоксипином по дозовой распространенности эффекта уменьшения аллоксановой гипергликемии и над реамберинем по способности

предотвращать аллоксан-индуцированный прирост “поведения отчаяния”.

Отдельного внимания заслуживают результаты оценки ОАИ-модулирующего действия  $\alpha$ -ЛК, которая была выбрана в качестве препарата сравнения из-за сходства с производными 3-оксипиридина и янтарной кислоты по способности уменьшать гипергликемию и выраженность нейрпатических расстройств при СД [6, 8]. Было установлено, что внутрибрюшинное введение  $\alpha$ -ЛК непосредственно после введения мышам аллоксана вызвало дозозависимое увеличение летальности в 2,2 – 3 раза относительно группы “контроль ОАИ” (табл. 2). Данный феномен может быть связан с прямым прооксидантным действием  $\alpha$ -ЛК [7], обуславливающим потенцирование свободнорадикального механизма цитотоксичности аллоксана в отношении  $\beta$ -клеток островков Лангерганса [14]. Не исключено также, что потенцирование токсичности аллоксана при введении  $\alpha$ -ЛК обусловлено её раздражающим действием, которое могло привести к развитию асептического перитонита при внутрибрюшинном введении соответствующего препарата. Гибель подавляющего большинства животных, получавших  $\alpha$ -ЛК не позволила оценить влияние этого ЛС на гликемию и поведение животных с ОАИ.

В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном уменьшении токсических эффектов аллоксана под действием эмоксипина, реамберина и мексидола. Это иллюстрирует перспективу дальнейшего изучения отечественных производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты как потенциальных средств профилактики вторичного повреждения  $\beta$ -клеток островков Лангерганса при СД2, а также первичного поражения  $\beta$ -эндокриноцитов в группах риска по развитию аутоиммунного инсулита. Учитывая известные возрастные ограничения по применению изученных ЛС, особого внимания заслуживает перспектива их использования для первичной профилактики LADA варианта СД. Наиболее перспективным для дальнейших исследований в этом направлении является мексидол, представляющий производное 3-оксипиридина и янтарной кислоты одновременно и обладающий самым выраженным ОАИ-протекторным действием.

## ВЫВОДЫ

1. Оригинальные отечественные производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты (эмоксипин, реамберин и

мексидол) оказывают протекторное действие в отношении развития гипергликемии, сопутствующего снижения активности в “открытом поле” и увеличения длительности “поведения отчаяния” при острой аллоксановой интоксикации у мышей.

2. Наиболее выраженным протекторным действием при острой аллоксановой интоксикации обладает мексидол, который превосходит эмоксипин по дозовой распространенности эффекта уменьшения аллоксановой гипергликемии и реамберин по способности предотвращать аллоксан-индуцированный прирост “поведения отчаяния”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенкова, В. З. Ланкин и др., *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания*, АРТА, Новосибирск (2008).
2. И. А. Волчегорский, В. Э. Цейликман, О. Б. Цейликман и др., *Вестн. РАМН*, № 8, 21 – 25 (2005).
3. И. А. Волчегорский, И. И. Долгушин, О. Л. Колесников, В. Э. Цейликман, *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*, Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, Челябинск (2000).
4. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, И. Ю. Мирошниченко, *Бюл. экспер. биол.*, **155**(1), 63 – 70 (2013).
5. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, И. Ю. Мирошниченко, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 26 – 31 (2013).
6. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, М. И. Колядич, М. Н. Алексеев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **74**(11), 17 – 23 (2011).
7. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, И. Ю. Мирошниченко и др., *Бюл. экспер. биол.*, **150**(9), 295 – 301 (2010).
8. И. А. Волчегорский, М. Н. Алексеев, М. И. Волчегорская, Л. М. Рассохина, *Клин. мед.*, № 10, 52 – 59 (2008).
9. Р. А. Копаладзе, *Усп. физиол. наук*, **29**(4), 74 – 92 (1998).
10. D. Ziegler, H.-J. Tritschler, И. А. Строков, А. С. Аметов, *Фарматека*, № 17, 28 – 36 (2008).
11. L. Steru, R. Chermat, B. Thierry, P. Simon, *Psychopharmacol. (Berlin)*, **85**(3), 367 – 370 (1985).
12. P. Ježek, A. Dlasková, L. Plecítá-Hlavatá, *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2012**, ID 932838 (2012).
13. R. Dantzer, K. W. Kelley, *Brain behav immun.*, **21**(2), 153 – 160 (2007).
14. S. Lenzen, *Diabetol.*, **51**(2), 216 – 226 (2008).

Поступила 23.09.13

## PROTECTIVE EFFECT OF 3-OXYPYRIDINE AND SUCCINIC ACID DERIVATIVES UNDER CONDITIONS OF ACUTE ALLOXAN-INDUCED INTOXICATION IN MICE

I. A. Volchegorskii, I. Yu. Miroshnichenko, L. M. Rassokhina, M. P. Malkin, R. M. Faizullin, K. E. Pryakhina, and A. V. Kalugina

Pharmacology Department, South-Urals State Medical University, ul. Vorovskogo 64, Chelyabinsk, 454092, Russia

Protective action of 3-oxypyridine and succinic acid derivatives (emoxipin, reamberin and mexidol) was studied in mice under acute alloxan-induced intoxication conditions. All these drugs exhibited protective action with respect to hyperglycemia and hyperglycemia-connected elongation of desperate behavior in the tail-suspension test and reduced activity level on the open field test. Mexidol exceeded emoexipin in the dose range of protecting action with respect to alloxan-induced hyperglycemia and was superior to reamberin in the treatment of desperate behavior in the tail-suspension test.

**Keywords** 3-oxypyridine and succinic acid derivatives; acute alloxan-induced intoxication