



Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием

Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹, Х.Х. Семёнов¹, С.В. Оковитый²,
В.Ц. Болотова², В.Н. Юсовец²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Выполнен статистический анализ закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений, являющихся солями энергодающих кислот цикла Кребса. По уровню антигипоксической активности исследуемые соединения сопоставимы с Пирацетамом и Предукталом. Показано, что выбор аниона существенно влияет на эффективность антигипоксического действия таких солей. Наиболее активными соединениями были сукцинат и L-малат. Антигипоксическая активность L-малата в 1,5 раза превосходит активность соответствующей рацемической соли.

Ключевые слова: антигипоксическая активность, ноотропы, антигипоксанты, кислоты цикла Кребса.

Введение

По данным ВОЗ, количество астений и астеноподобных состояний за последние 65 лет выросло в 24 раза, а в США достигло 25 млн человек. В роли провоцирующих факторов, вызывающих заболевание или способствующих его обострению, выступают стрессовые ситуации, воздействие избыточного информационного потока, рассогласование циркадианных ритмов, влияние неблагоприятных климатических факторов, вибрация, воздействия высокочастотных электромагнитных полей, острые

вирусные респираторные или очаговые инфекции, хронические интоксикации (в т.ч. – алкогольные), последствия черепно-мозговых травм и нейроинфекций, эндокринный дисбаланс в периоды возрастной гормональной перестройки. Отдельной актуальной медицинской проблемой стал «синдром хронической усталости», частота встречаемости которого в мире достигает 30% всего взрослого населения.

Основной группой препаратов, используемых для лечения астенических состояний любого генеза, являются но-

отропные средства. Несмотря на достаточно большую историю этой группы лекарственных препаратов (более 50 лет), их арсенал является явно недостаточным. Основными представителями группы являются производные Пирролидона (Пирацетам, Анироцетам, Оксипирацетам, Прамирацетам), а также нейропептиды и их аналоги (Семакс, Тиролиберин, Церебролизин, Кортексин, Ноопепт). Их существенными недостатками являются необходимость длительного (часто – многомесячного) приема до начала отчетливых проявлений ноотропного и антиастенического действия, неуниверсальность и нестабильность эффекта при различных причинах и механизмах формирования астенических состояний. В связи с этим, задача разработки новых более эффективных ноотропных и антиастенических средств является актуальной не только для отечественного, но и для мирового здравоохранения.

Для многих нейротропных лекарственных средств, являющихся производными аминокислот (Пантогам, Фенибут, Аминалон, Фенотропил, Деанола Ацеглумат), и предшественников холина (Деанол, Панклар, Центрофеноксин, Тонибрал, Глиатилин, Нооклер) характерны эффекты ноотропных препаратов. Частичные свойства ноотропов проявляют препараты, улучшающие энергетические возможности нейронов (цереброваскулярные препараты, антиоксиданты, антигипоксанты, производные янтарной кислоты, энергодающие субстраты, предшественники нуклеотидов).

При анализе химической структуры препаратов с отчетливыми ноотропными и антиастеническими свойствами

можно выделить наличие фармакофорной группировки предшественника холина в эфирной связи с аминокислотами. Новые производные эфиров предшественников холина могут стать основой для формирования широкого ряда нейротропных лекарственных средств с ноотропным и антиастеническим действием, существенной стороной которого будет повышение устойчивости организма к гипоксическому воздействию. По аналогии с известными антигипоксантами и антиоксидантами (Амтизола сукцинат, Мексидол, Реамберин), соль такого основания с интермедиатами цикла Кребса должна оказывать более выраженное действие, чем исходное основание.

Цель работы – изучить закономерности, характеризующие влияние анионов-остатков энергодающих кислот цикла Кребса на антигипоксическую активность солей этих кислот, основанием в которых выступает эфирное производное предшественника холина.

Материалы и методы

Исследуемые соединения (эфирное производное предшественника холина в качестве основания, и его сукцинатная, малатная и кетоглутаровая соли) были синтезированы на кафедре органической химии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии (заведующий кафедрой – профессор Яковлев И.П.). В качестве препаратов сравнения использовались аптечные препараты Пирацетам (производства ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА») и Триметазидин (Предуктал МВ, производства ООО «Сердикс» – аффилированной компании Servier).

Объектами исследования послужили белые лабораторные крысы Wistar массой 200–220 г. Опытные группы животных содержали по 5 особей обоего пола, контрольная группа – по 15 особей обоего пола. Животные были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных осуществлялось в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и с Руководством [3].

Гипоксическое воздействие создавалось подъемом лабораторных животных в барокамере проточного типа на «высоту» 11500 м при скорости подъема 165 м/с. В ходе пребывания животных на «высоте» регистрировались индивидуальные показатели гипоксической устойчивости (время жизни, время сохранения и восстановления позы) с расчетом бального комплексного показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии, характеризующего нормальным статистическим распределением [1, 2].

Исследуемые препараты и препараты сравнения вводились животным после растворения в воде для инъек-

ций, внутривенно с помощью зонда, в объеме 0,2 мл, за 1 ч до начала барокамерного исследования. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора. Исследуемые препараты вводились в дозе 25 мг/кг, препараты сравнения – в дозах, эквивалентных среднему терапевтическому для человека (Пирацетам – 120 мг/кг, Предуктал – 0,5 мг/кг).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом дисперсионного факторного анализа (пакет анализа для табличного процессора Microsoft Excel).

Результаты и их обсуждение

Профилактическое введение (за 1 ч до барокамерного воздействия) исследуемых препаратов и препаратов сравнения обеспечивало выраженную защиту мозга животных от гипоксического воздействия (табл. 1, рис. 1).

Анализ табл. 1 показывает, что соли эфирного производного предшественника холина и энергодающих кислот цикла Кребса проявляют антигипоксическую

Таблица 1
Влияние профилактического введения препаратов на время жизни животных на критической высоте

Препарат	Время жизни, сек	% от контроля	Коэффициент вариации (КВ)	Степень влияния (D)	Достоверность различий (p)
Контроль	231±34	100	0,81	-	-
Пирацетам	1416±256	612	0,57	0,60	$4 \cdot 10^{-9}$
Предуктал	1039±142	450	0,43	0,64	$8 \cdot 10^{-10}$
R-основание	432±101	187	0,74	0,135	0,02
R-сукцинат	1475±249	638	0,53	0,64	$7 \cdot 10^{-10}$
R-кетоглутарат	681±49	295	0,23	0,55	$5 \cdot 10^{-8}$
R-DL-малат	629±201	272	1,01	0,20	0,004
R-L-малат	926±182	401	0,62	0,48	$9 \cdot 10^{-7}$

активность, сопоставимую с антигипоксической активностью референс-препаратов Пирацетама и Предуктала. Однако обращает на себя внимание высокая степень индивидуальной вариативности эффекта (высокие значения коэффициента вариации). Следовательно, для части животных антигипоксическая активность может оказаться недостаточной, несмотря на высокий, в целом, уровень влияния препарата на показатель времени жизни. Это может быть связано с тем, что сам показатель времени жизни на высоте не является оптимальным, так как параметры его статистического распределения далеки от параметров нормального распределения и отражают вариативность экстремальности воздействия на отдельных животных.

Как было показано ранее [2], статистически более надежную картину, позволяющую проводить сопоставление разных серий исследования и популяционную экстраполяцию полученных результатов, дает показатель «индекс устойчивости гипоксии» (ИУГ), определяемый на основе нормализованных балльных оценок трех показателей, характеризующих устойчивость животных к гипоксии (время жизни на высоте,

время первого падения (период поддержания позы) и время восстановления позы после прекращения гипоксического воздействия).

Сопоставление результатов проведенных исследований по показателю ИУГ представлено на рис. При этом необходимо отметить, что коэффициент вариации для отдельных подгрупп животных находится в диапазоне 0,10-0,30, и только в контрольной группе достигает уровня 0,40.

Отличия от контроля были достоверны для всех препаратов, кроме R-основания. Наиболее активной из изученных солей эфирного производного предшественника холина в модели острой гипоксической гипоксии была янтарнокислая соль.

Наличие достаточно высокого разброса между средними значениями антигипоксической активности отдельных препаратов по показателю времени жизни на критической высоте (табл. 1) позволило выполнить факторный анализ значимости основания и анионного компонента солей в их суммарной антигипоксической активности. Результаты выполненного двухфакторного анализа представлены в табл. 2.

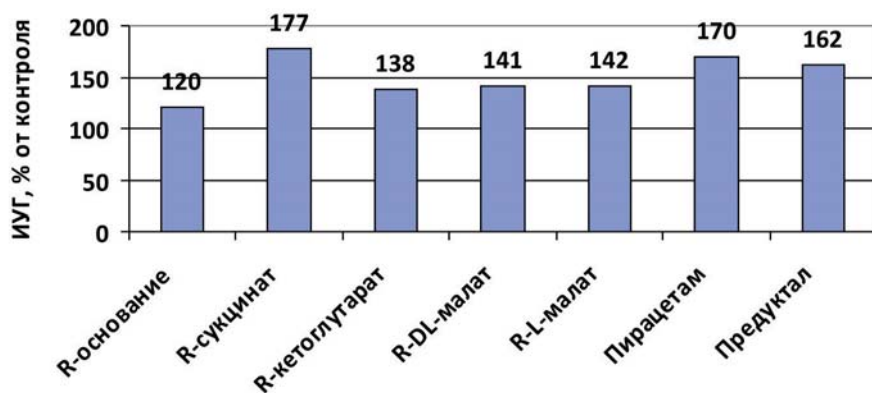


Рис. Антигипоксическая активность исследованных препаратов по показателю ИУГ.

Таблица 2

Результаты двухфакторного анализа антигипоксической активности энергодающих солей кислот цикла Кребса и диметиламиноэтанольного эфирного производного

Наименование фактора	Влияние фактора (D)	Достоверность модели (p)
Фактор А – основание	0,135	0,02
Фактор В – кислотный остаток	0,270	0,004
Взаимодействие факторов А*В	0,025	0,78
Итого контролируемые факторы	0,43	$6 \cdot 10^{-8}$
Неконтролируемые факторы	0,53	

Таким образом, состав изучаемых солей является значимым фактором, достоверно объясняющим 43% всей вариативности индивидуальных показателей времени жизни животных на критической высоте. Значимость кислотного остатка в антигипоксической активности изученных солей в 2 раза превышает значимость основания (0,270 и 0,135 соответственно). Однако превалирующее значение имеют неконтролируемые факторы (53% всей вариативности индивидуальных значений времени жизни животных на критической гипоксии).

К числу таких неконтролируемых факторов может относиться разный исходный уровень индивидуальной резистентности животных к гипоксии. Его нивелирование представляет значительные методические трудности (например, проведение предварительного барокамерного подъема на некритическую высоту и отсев животных с резко сниженной устойчивостью к гипоксии, использование специально выведенных линий животных с заданным уровнем устойчивости к гипоксии).

Возможно, некоторое значение может иметь и фактор дозы. Несмотря на то, что в эксперименте использовалась стандартная дозировка 25 мг/кг, с учетом разного молекулярного веса кис-

лотного аниона, в эффективное межмолекулярное взаимодействие у разных препаратов могло вступать разное число молекул соединения. Вероятно, в сериях исследований с применением различных фармакологически активных веществ более сопоставимые результаты могут быть получены при использовании молярного принципа дозирования, чем концентрационного.

К категории не учтенных в данном эксперименте факторов может быть отнесен и фактор изомерии анионов. Так, в работе изучались две яблочнокислые соли – рацемический DL-малат и изомерный L-малат. Установлено, что антигипоксическая активность L-малата в 1,5 раза выше рацемической соли. Дисперсионный факторный анализ, выполненный по этим двум подгруппам, показал, что фактор изомерии анионов определяет 6% общей вариации показателя времени жизни животных на критической высоте. Данное влияние не имело статистически достоверного характера ($p=0,29$). Однако при включении в исследование возможных изомерных анионов других солей, за счет увеличения числа наблюдения, уровень достоверности может выйти, как мы предполагаем, на статистически значимый уровень.

Выводы

1. Новые синтетические соединения – соли энергодающих кислот цикла Кребса и эфирного производного предшественника холина проявляют антигипоксическую активность, сопоставимую с Пирацетамом и Предукталом.

2. В реализации антигипоксической активности таких солей анион (кислотный остаток) играет существенную и достоверную роль. С ним связано, в среднем, 27% всей вариативности времени жизни животных на критической высоте.

3. Вклад в антигипоксическую активность солей основания – эфирного производного предшественника холина является статистически достоверным. Его степень влияния на вариативность времени жизни животных на критической высоте составляет 13,5%.

4. Янтарная соль эфирного производного диметиламиноэтанола проявляет более высокую, по сравнению с другими исследованными солями, антигипоксическую активность. Умеренная антигипоксическая активность, сопоставимая с референс-препаратами, также характерна для L-яблочнокислой соли.

5. В силу определенного параллелизма в антигипоксической и нейропротекторной активности, новые синтезированные соединения – соли энергодающих кислот цикла Кребса и эфирного производного предшественника холина могут быть перспективными объектами разработки лекарственных средств с ноотропной активностью, а также для изучения антигипоксической активности на иных моделях (например, ишемии миокарда, ишемии мозга, ишемии кожного лоскута и т.д.).

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. 2013. № 1. С. 7-17.
2. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. - М. 1990. 18 с.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина. 2013. № 4. С. 149-157.

Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, S.V. Okovitiy,
V.Ts. Bolotova, V.N. Yuskovets

Statistical analysis of the laws that determine antihypoxic activity of the compounds, which salts energomash acids Krebs cycle was performed. The antihypoxic activity level of the studied compounds comparable with the level of Piracetam and Preductal. It was shown that the choice of anion substantially affects the efficiency of antihypoxic activity of such salts. The most active compounds were succinate and L-malate. L-malate antihypoxic activity in 1,5 times exceeds a corresponding activity of racemic salt.

Key words: antihypoxic activity, nootropics, antihypoxants, Krebs cycle acids.