

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

¹Белова О.А., ¹Балашов В.П., ¹Морозов М.А., ¹Комнатов Е.Д., ¹Поляков Д.А.,
²Скачилова С.Я., ¹Агеносова О.Г.

¹Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, e-mail: belovaoa-82@inbox.ru;

²АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», Старая Купавна

Целью нашего исследования являлось изучение антигипоксической активности некоторых производных аминокислот и никотиновой кислоты на модели гиперкапнической гипоксии. 56 белым нелинейным лабораторным мышам обоего пола внутрибрюшинно вводили растворы исследуемых субстанций, имеющих шифры разработчика ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22, ЛХТ 9-22, ЛХТ 3-23, и препаратов сравнения, в качестве которых были использованы этилметилгидроксипиридина сукцинат и пирацетам. После внутрибрюшинного изучения исследуемых субстанций и препаратов сравнения выдерживали 60-минутную экспозицию с дальнейшим помещением животных в экспериментальные условия нормобарической гипоксии с гиперкапнией. На основании продолжительности жизни мышей судили об антигипоксической эффективности исследуемых соединений. В ходе исследования было установлено, что внутрибрюшинное профилактическое введение ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22 и препаратов сравнения (этилметилгидроксипиридина сукцинат и пирацетам) в отличие от использования ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22 сопровождается статистически достоверным увеличением продолжительности жизни лабораторных мышей в условиях модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией. На основании полученных данных сделан вывод о том, что ЛХТ 19-19 и ЛХТ 7-22 в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией, по антигипоксическому эффекту, не уступают препаратам сравнения этилметилгидроксипиридина сукцинату и пирацетаму.

Ключевые слова: гиперкапническая гипоксия, антигипоксанты, ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22, ЛХТ-9-22, ЛХТ 3-23, этилметилгидроксипиридина сукцинат, пирацетам.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIHYPOXIC ACTIVITY SOME DERIVATIVES OF AMINO ACIDS AND NICOTINIC ACID

¹Belova O.A., ¹Balashov V.P., ¹Morozov M.A., ¹Komnatova E.D., ¹Polyakov D.A.,
²Skachilova S.Ya., ¹Agenosov O.G.

¹National Research Mordovian State University, Saransk, e-mail: belovaoa-82@inbox.ru;

²JSC "All-union scientific center for the safety of biologically active substances", Staraya Kupavna

The purpose of the work was to study the antihypoxic activity of some amino acid derivatives and nicotinic acid on a model of hypercapnic hypoxia. 56 white nonlinear laboratory mice of both sexes were intraperitoneally injected with solutions of the studied substances having the developer codes LHT 19-19, LHT 7-22, LHT-9-22, LHT 3-23 and comparison drugs, which were used as ethylmethylhydroxypyridine succinate and piracetam. After an intraperitoneal examination of the studied substances and comparison preparations, a 60-minute exposure was maintained with further placement of the animals in experimental conditions of normobaric hypoxia with hypercapnia. Based on the lifespan of mice, the antihypoxic efficacy of the studied compounds was judged. During the study, it was found that intraperitoneal prophylactic administration of LHT-19-19, LHT 7-22 and comparison drugs (ethylmethylhydroxypyridine succinate and piracetam), in contrast to the use of LHT 3-23 and LHT 9-22, is accompanied by a statistically significant increase in the life expectancy of laboratory mice in a model of normobaric hypoxia with hypercapnia. Based on the data obtained, it was concluded that LHT-19-19 and LHT 7-22 in conditions of normobaric hypoxia with hypercapnia, the antihypoxic effect is not inferior to the comparison drugs ethylmethylhydroxypyridine succinate and piracetam.

Keywords: hypoxia, antihypoxants, LHT 19-19, LHT 7-22, LHT-9-22, LHT 3-23, ethylmethylhydroxypyridine succinate, piracetam.

Введение

Гипоксия (от греческого *hypo* – «ниже, под» и *oxigenium* – «кислород») - патологическое состояние, наступающее при недостаточном снабжении тканей организма

кислородом или нарушении его утилизации в процессе биологического окисления. Гипоксия возникает при воздействии различных внешних и внутренних факторов, в том числе при критических состояниях, связанных с болезнью или повреждением органов и тканей [1]. Помимо системы здравоохранения, проблема гипоксии занимает особое место в силовых структурах и в Вооружённых силах Российской Федерации. Это обстоятельство связано с тем, что зачастую личному составу указанных ведомств приходится ликвидировать последствия экстремальных ситуаций, сопровождающихся кислородной недостаточностью. Независимо от этиологического фактора формирование гипоксии сопровождается снижением внутриклеточного количества макроэргических соединений, снижением аэробного метаболизма с расстройством клеточных функций и гибелью клетки [2].

В зависимости от метаболических потребностей, способности функционировать в анаэробных условиях, а также запасов энергии и кислорода жизнеспособность клеток может варьировать в широком диапазоне [2]. Так, в условиях отсутствия кровотока выраженное нарушение функций клеток коры головного мозга произойдёт через 1 минуту, миокарда через 5 минут, печени и почек через 10 минут [3]. В отличие от острой, хроническая гипоксия сопровождается поэтапным расстройством функций органов и тканей [4].

Падение парциального давления кислорода в митохондриях ниже 0,13 кПА сопровождается сменой аэробного механизма выработки энергии в клетке на менее эффективный анаэробный. Результатом этого процесса является поступление в системный кровоток большого количества молочной кислоты, развитие метаболического ацидоза, редукция трансмембранных ионных градиентов с расстройством функции ионных насосов и патологическим увеличением внутриклеточной концентрации электролитов с последующей гибелью клетки [3].

В зависимости от способностей существовать в условиях анаэробного метаболизма, а также наличия резерва энергии и кислорода зависит продолжительность клеточной жизни. Несмотря на восстановление оксигенации и перфузии, в ишемизированных органах и тканях может наступить так называемый реперфузионный синдром [5]. Суть данного синдрома заключается в том, что при восстановлении кровотока в ишемизированных тканях происходит нарушение баланса между продукцией активных форм кислорода и способностью организма их нейтрализовать, что сопровождается быстрым прогрессированием деструктивных изменений в клетке [6]. Кроме того, на ранних стадиях для данного синдрома характерно наличие перераспределения крови и её шунтирование между разными функциональными отделами ишемизированных тканей, с наличием микроциркуляторных очаговых нарушений кровотока [5].

В связи с тем, что восстановление кровотока в ишемизированных органах и тканях выполняется с целью устранения ишемии, а в результате происходит дополнительное (нередко необратимое) повреждение клеток, данный феномен получил название «реперфузионный парадокс» [5]. Учитывая, что реперфузионный синдром является системным процессом, в ходе его развития происходит повреждение всех органов и тканей организма.

На протяжении длительного времени врачи активно используют лекарственные средства, обладающие модулирующим и стимулирующим эффектом влияния на различные компенсаторно-приспособительные реакции организма, что сопровождается повышением устойчивости человека к гипоксии, а также сокращением времени нормализации функционального состояния клеток после эпизода гипоксии [7]. Данные лекарственные средства объединены в самостоятельный класс лекарственных препаратов, называемых антигипоксантами. Помимо антигипоксантов, для лечения патологических состояний, сопровождающихся гипоксией и реперфузионным синдромом, широкое применение получила группа препаратов, называемых антиоксидантами [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Антиоксиданты – вещества, способные вступать во взаимодействие с разнообразными реактогенными окислителями, активными формами кислорода, другими свободными радикалами с последующей их полной или частичной инактивацией [9].

Несмотря на очевидное преимущество использования данных групп лекарственных препаратов, в их основе лежит метаболический тип действия, что обуславливает развитие отсроченного, накопительного эффекта, а также отсутствие возможности полного восстановления нарушенных метаболических процессов в органах и тканях [7]. Таким образом, поиск новых эффективных лекарственных средств, обладающих антигипоксантным эффектом, является актуальной проблемой современной фармакологии.

Цель исследования: изучить антигипоксическую активность некоторых производных аминокислот и никотиновой кислоты на модели гиперкапнической гипоксии.

Материалы и методы исследования

Предметом исследования явились новые перспективные субстанции: ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22, ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22, синтезированные в АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (Россия) под руководством доктора химических наук, профессора С.Я. Скачиловой. В качестве препаратов сравнения использовали этилметилгидроксипиридина сукцинат («Мексидол», фирма-производитель, «ЗиО-ЗДОРОВЬЕ, ЗАО», Россия) и пирацетам («Пирацетам», фирма-производитель, SHREYA LIFE SCIENCES, Pvt.Ltd, Индия).

Эксперименты были выполнены на базе центра перспективных исследований инновационных лекарственных средств Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П.

Огарева» на 156 белых нелинейных мышах обоего пола, содержащихся в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Исследования были выполнены в два этапа.

На первом этапе для каждого исследуемого вещества были изучены показатели ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении белым мышам (100 животных). Стартовые дозы для всех исследуемых субстанций составляли 50,0 мг/кг, далее 250,0, 500,0, 750,0 мг/кг. Максимальная испытанная доза была определена как 1000,0 мг/кг. Водные растворы субстанций или суспензии, подготовленные с применением ТВИН 80, вводили в объемах, не превышающих 0,5 мл. Каждая доза веществ испытывалась на пяти животных. Наблюдение за животными осуществляли в первые сутки через каждые 2 часа. Вторые сутки через каждые 6 часов и далее 15 суток с интервалом 1 раз в 24 часа. Данные об острой токсичности мексидола и пирацетама были найдены нами в литературных источниках.

На втором этапе исследовали собственно антигипоксические свойства соединений и препаратов сравнения. При выполнении данного блока исследований подопытные животные были разделены на 7 групп. Группу 1 составили мыши группы контроля. Моделирование гиперкапнической гипоксии у этих мышей осуществляли на фоне внутрибрюшинного введения стерильной воды для инъекций (n=8). Группа 2 была представлена мышами с моделированием гиперкапнической гипоксии на фоне внутрибрюшинного введения ЛХТ 19-19 (n=8). Группу 3 составили мыши с моделированием гиперкапнической гипоксии на фоне внутрибрюшинного введения ЛХТ 7-22 (n=8). В группу 4 были включены мыши с моделированием гиперкапнической гипоксии на фоне внутрибрюшинного введения ЛХТ 3-23 (n=8). Группу 5 сформировали мыши с моделированием гиперкапнической гипоксии на фоне внутрибрюшинного введения ЛХТ 9-22 (n=8). Группу 6 образовали мыши с моделированием гиперкапнической гипоксии на фоне внутрибрюшинного введения этилметилгидроксипиридина сукцината (n=8). Заключительная группа 7 была сформирована мышами, которым также моделировали гиперкапническую гипоксию, но на фоне внутрибрюшинного введения пирацетама (n=8).

Моделирование гиперкапнической гипоксии проводилось в соответствии с Методическими рекомендациями по доклиническому изучению антигипоксической активности лекарственных средств [10]. Мышей поодиночке помещали в пустые стеклянные банки объемом 250 мл, которые закручивали крышками с уплотнителем. С целью дополнительной герметизации и полного исключения попадания воздуха банки дополнительно герметизировали при помощи прозрачного скотча. По мере потребления кислорода животными его концентрация во вдыхаемом воздухе снижается, а углекислого газа

повышается, что и приводит животных к гибели. Регистрировалась продолжительность жизни животных.

Исследуемые субстанции и препараты сравнения вводили мышам внутривентрально за 60 минут до моделирования гиперкапнической гипоксии. ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22, ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22 вводили в дозе 100 мг/кг. С целью улучшения растворимости ЛХТ 19-19 и ЛХТ 9-22 перед добавлением растворителя в порошок исследуемой субстанции добавляли 2 капли полисорбата 80 (твин 80). Этилметилгидроксипиридина сукцинат и пирацетам вводили в дозе 100 и 120 мг/кг соответственно. В качестве растворителя использовали 0,4 мл стерильной воды для инъекций. Животным группы контроля также внутривентрально вводили 0,4 мл стерильной воды для инъекций с целью исключения влияния внутривентрального введения на результаты эксперимента. Контроль проводили параллельно с экспериментом.

О начале гипоксических изменений судили по наличию следующих признаков: учащённое дыхание, беспокойство животного, судороги. Наблюдение за животными осуществляли до наступления смерти, о чём свидетельствовали отсутствие реакции на внешние раздражители, отсутствие дыхания и движений. После окончания эксперимента производилось дополнительное вскрытие мышей с целью исключения возможного повреждения внутренних органов и сосудов во время внутривентрального введения исследуемых соединений.

Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента для несвязанных совокупностей.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования испытуемых нами соединений мы провели изучение их острой токсичности при внутривентральном введении белым мышам. Диапазон вводимых доз составил 50,0-1000,0 мг/кг. Результаты исследования свидетельствуют о высокой безопасности всех четырех субстанций. Нам не удалось выявить дозы, приводящие подопытных животных к смерти. Внутривентральное введение ЛХТ 19-19, ЛХТ 7-22, ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22 даже в максимально использованной дозе 1000,0 мг/кг не вызывало признаков интоксикации, изменения подвижности, нарушения дыхания, аппетита и других внешних признаков поведения животных. Согласно данным литературы [11], аналогичными токсикологическими свойствами обладает пирацетам. ЛД₅₀ для отечественного антиоксидантного средства мексидола, по данным [12], определяется на уровне 412±15 мг/кг. Сравнительные данные показателей острой токсичности испытуемых соединений и препаратов сравнения суммированы в таблице 1.

Таблица 1

Показатели острой токсичности исследуемых соединений и препаратов сравнения при
внутрибрюшинном введении белым мышам

Вещество/препарат	ЛД ₅₀ мг/кг (внутрибрюшинно)
Мексидол	412±15 [12]
Пирацетам	Гибель животных отсутствует даже при внутривенном введении мышам 1000,0 мг/кг [11]
ЛХТ 19-19 (n=10)	Гибель животных отсутствует в диапазоне доз 50,0-1000,0 мг/кг
ЛХТ 7-22 (n=10)	Гибель животных отсутствует в диапазоне доз 50,0-1000,0 мг/кг
ЛХТ 3-23 (n=10)	Гибель животных отсутствует в диапазоне доз 50,0-1000,0 мг/кг
ЛХТ 9-22 (n=10)	Гибель животных отсутствует в диапазоне доз 50,0-1000,0 мг/кг

Далее нами была исследована антигипоксическая активность изучаемых соединений и препаратов сравнения на модели гиперкапнической гипоксии. Маркерами начала гипоксических изменений служили следующие признаки: учащенное дыхание, беспокойство животного, судороги. Критериями гибели животных являлись их обездвиживание и остановка дыхания. Средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы в условиях моделирования гиперкапнической гипоксии без лекарственной поддержки в среднем составила 20,06±0,84 мин. Профилактическое внутрибрюшинное введение ЛХТ 19-19 и ЛХТ 7-22 способствовало статистически достоверному увеличению продолжительности жизни животных, которая составила соответственно 23,81±1,36 и 23,56±1,32 мин. Данное повышение показателей соответствует 15% пролонгирования срока жизни.

Аналогичный эффект наблюдали при изучении влияния препаратов сравнения. Так, на фоне предварительного внутрибрюшинного введения этилметилгидроксипиридина сукцината и пирацетама продолжительность жизни мышей в условиях гиперкапнической гипоксии составила соответственно 23,77±0,91 и 23,24±1,18 мин. соответственно. Эффекты препаратов сравнения также соответствуют увеличению продолжительности жизни животных на 15%. При профилактическом внутрибрюшинном введении ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22 продолжительность жизни лабораторных мышей, в условиях исследуемой модели гипоксии, статистически значимо не отличалась от такового показателя у контрольных животных и

составила соответственно $20,44 \pm 0,67$ и $19,64 \pm 1,28$ мин. Информация об антигипоксических свойствах исследуемых соединений и препаратов сравнения суммирована в таблице 2.

Таблица 2

Продолжительность жизни мышей на модели гиперкапнической гипоксии
в исследуемых группах

Группа животных	Средняя продолжительность жизни (мин.)
Группа контроля	$20,06 \pm 0,84$
Гиперкапническая гипоксия + ЛХТ 19-19 (n=8)	$23,81 \pm 1,36^*$
Гиперкапническая гипоксия+ЛХТ 7-22 (n=8)	$23,56 \pm 1,32^*$
Гиперкапническая гипоксия+ЛХТ 3-23 (n=8)	$20,44 \pm 0,67$
Гиперкапническая гипоксия+ЛХТ 9-22 (n=8)	$19,64 \pm 1,28$
Гиперкапническая гипоксия+пирацетам (n=8)	$23,24 \pm 1,18^*$
Гиперкапническая гипоксия+ этилметилгидроксипиридина сукцинат (n=8)	$23,77 \pm 0,91^*$

Примечание: * – различия при сравнении с животными группы контроля статистически достоверны при $p < 0,05$ (t-критерия Стьюдента).

При вскрытии животных не было обнаружено повреждений внутренних органов и сосудов, что свидетельствовало о правильности выполнения техники внутрибрюшинного введения лекарственных средств и отсутствии влияния возможных повреждений внутренних органов на результаты эксперимента.

В заключение хотелось бы отметить, что проведенное нами исследование свидетельствует о низком уровне показателей острой токсичности у всех испытуемых нами производных аминокислот и никотиновой кислоты, что предполагает высокую степень их безопасности. По своим токсикологическим свойствам изученные соединения близки к пирацетаму и превосходят известный отечественный препарат мексидол. Два изученных нами соединения (ЛХТ 19-19 и ЛХТ 7-22) проявили заметную антигипоксическую активность, не уступающую активности выбранных нами препаратов сравнения. Результаты исследования открывают перспективу для испытания специфической активности данной группы веществ на других моделях гипоксии.

Выводы

1. Профилактическое внутрибрюшинное введение ЛХТ 19-19 и ЛХТ 7-22 в дозе 100 мг/кг на модели гиперкапнической гипоксии способствует статистически достоверному увеличению продолжительности жизни лабораторных мышей.

2. Профилактическое внутрибрюшинное введение ЛХТ 3-23 и ЛХТ 9-22 в дозе 100 мг/кг на модели гиперкапнической гипоксии не сопровождается статистически достоверным увеличением продолжительности жизни лабораторных животных.

3. Субстанции ЛХТ 19-19 и ЛХТ 7-22 по своим антигипоксическим свойствам не уступают препаратам сравнения этилметилгидроксипиридина сукцинату и парацетаму.

Список литературы

1. Николаев С.В., Колясникова К.Н., Логвинов И.О., Кузнецова Е.А., Антипова Т.А. Нейропротекторное антигипоксическое действие циклопролилглицина и замещенных глипролинов на модели химической гипоксии в культуре гиппокампальных клеток линии НТ-22 // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тезисы докладов участников Международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Е.В. Барковского (Минск, 21 мая 2021 года). Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2021. С. 199-201.
2. Саркисова В.В., Наумонова А.А., Хегай Р.О. Аспекты состояния вегетативной нервной системы при гипоксии // Science and innovation. 2022. Т. 1, № D8. С. 228-231.
3. Орлов Ю.П., Свиридов С.В., Какуля Е.Н. Патофизиологические аспекты кислорода, гипоксии и свободнорадикального окисления при критических состояниях // Клиническое питание и метаболизм. 2021. Т. 2, № 2. С. 66-79.
4. Марсянова Ю.А., Звягина В.И., Сучкова О.Н. Способ моделирования нормобарической хронической гипоксии у крыс самцов сток WISTAR // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2022. Т. 10, № 2. С. 147-156.
5. Тимербулатов Ш. В., Тимербулатова М.В., Султанбаев А.У. Реперфузионный синдром в абдоминальной хирургии // Медицинский вестник Башкортостана. 2010. Т. 5, № 4. С. 145-151.
6. Кожухов С.Н., Пархоменко А.Н. Возможности фармакологической защиты миокарда при синдроме ишемии-реперфузии в эксперименте и клинической практике // Запорожский медицинский журнал. 2019. Т. 21, № 4 (115). С. 528-537.
7. Йигиталиева М., Алимов С.М., Хусанбоев Э. Механизмы биохимического и молекулярного действия антигипоксантных препаратов // International Journal of Education, Social Science & Humanities. 2024. Т. 12, № 4. С. 38-54.

8. Харченко В.З., Жукова А.А., Кубышкин А.В., Смирнова С.Н., Лященко О.И. Ингибиторы ферментов протеолиза и антиоксиданты в патогенетической терапии реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2017. Т. 7, № 3. С. 76-80.
9. Кушнярик Л.П. Антиоксиданты: классификация, строение и механизм действия // Научный форум: сборник статей Международной научно-практической конференции: в 2 ч. (Пенза, 27 января 2023 года). Пенза: Наука и Просвещение (ИП Гуляев Г.Ю.), 2023. С. 26-29.
10. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х., Дуля М.С. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации. М.: Издательство «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», 2017. 97 с.
11. Gouliarov A.H., Senning A Piracetam and other structurally related nootropics // Brain Research. Brain Research Reviews. 1994. № 19 (2). С. 180-222.
12. Карпова Е.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С. Влияние антиоксидантов на острую токсичность некоторых производных местных анестетиков // Здоровье и образование в XXI веке. 2006. Т. 8, № 7. С. 341.