

УДК 615.038



АДДИТИВНОЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА И ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ ГЕМОРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС

П.Д. Колесниченко¹, О.В. Щерблыкина¹, Н.И. Нестерова^{1,2}, Д.В. Щерблыкин¹, А.В. Нестеров¹, М.В. Покровский¹, М.А. Жученко³, А.В. Тверской¹, К.М. Резников⁴

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы» 308017, Россия, г. Белгород, ул. Волчанская, 159

³ Сектор разработки и доклинических исследований ГЛФ ООО «ФАРМАПАРК» 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 8, стр. 1

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации 394036, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

E-mail: farpavel@narod.ru

Получено 10.12.2019

Рецензия (1) 20.04.2020

Рецензия (2) 15.05.2020

Принята к печати 15.07.2020

Коррекция процессов свободно-радикального окисления является одной из наиболее перспективных стратегий нейропротекции при острых нарушениях мозгового кровообращения.

Цель исследования – экспериментальное изучение нейропротективных эффектов производных 3-гидроксипиридина и эритропоэтина, а также их комбинированного применения.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 109 крысах-самцах линии Вистар. Нейропротективное действие субстанций изучалось на модели геморрагического инсульта. Исследуемые препараты вводились животным внутрибрюшинно. Карбамилированный дарбэпоэтин вводился предварительно трехкратно в дозе 100 мкг/кг с интервалом 3 дня, последнее введение за 1 час до операции (суммарная доза – 300 мкг/кг). Этоксидол вводился однократно за 1 час до операции в дозе 50 мг/кг. Регистрировали выживаемость, особенности поведения и состояния животных на 1, 3, 7 и 14-е сутки, проводили морфологическую оценку головного мозга.

Результаты. Исследуемые вещества благоприятно влияли как на выживаемость животных в течение первых суток, так и на 14-суточную выживаемость. Наилучшие показатели выживаемости на 14-е сутки зафиксированы в группе комбинированного применения этоксидола и карбамилированного дарбэпоэтина (75%). Так, в этой группе крыс уже с первых суток наблюдалось более быстрое восстановление неврологических нарушений. К 7-м суткам более 50% крыс, получавших комбинацию исследуемых препаратов, имели легкий неврологический дефицит (до 3 баллов по шкале McGrow), к 14-м суткам у крыс этой группы выявлялись лишь незначительные изменения в неврологическом статусе. Выраженный нейропротекторный эффект комбинации производных 3-гидроксипиридина и эритропоэтина подтвержден гистологическим исследованием тканей головного мозга – более быстрое уменьшение перифокального отека и нарушений микроциркуляции, меньшее повреждение нейронов и глиальных элементов и более быстрые процессы резорбции и организации кровоизлияния. При макроскопическом исследовании окрашенных трифенилтетразолием хлористым срезов мозга умирающих крыс установлено, что перифокальный некроз является основной причиной высокой летальности в контрольной группе после 3 суток.

Заключение. В результате эксперимента доказано нейропротективное действие исследуемых производных 3-гидроксипиридина и эритропоэтина. При этом комбинация данных препаратов показала большую нейропротективную активность, чем изолированное их применение. Аддитивное действие данных препаратов обуславливается их механизмом действия в результате взаимодействия с различными структурами и компонентами клетки.

Ключевые слова: геморрагический инсульт, 3-гидроксипиридины, карбамилированный дарбэпоэтин, нейропротекция

Для цитирования: П.Д. Колесниченко, О.В. Щерблыкина, Н.И. Нестерова, Д.В. Щерблыкин, А.В. Нестеров, М.В. Покровский, М.А. Жученко, А.В. Тверской, К.М. Резников. Аддитивное нейропротективное действие производных 3-гидроксипиридина и эритропоэтина человека на модели геморрагического инсульта у крыс. *Фармация и фармакология*. 2020;8(3):169-180. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-3-169-180

© П.Д. Колесниченко, О.В. Щерблыкина, Н.И. Нестерова, Д.В. Щерблыкин, А.В. Нестеров, М.В. Покровский, М.А. Жученко, А.В. Тверской, К.М. Резников, 2020

For citation: P.D. Kolesnichenko, O.V. Scheblykina, N.I. Nesterova, D.V. Scheblykin, A.V. Nesterov, M.V. Pokrovskiy, M.A. Zhuchenko, A.V. Tverskoy, K.M. Reznikov. Additive neuroprotective effect of 3-hydroxypyridine derivatives and human erythropoietin analogue on a hemorrhagic stroke model in rats. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(3):169-180. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-3-169-180

ADDITIVE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVES AND HUMAN ERYTHROPOETIN ANALOGUE ON A HEMORRHAGIC STROKE MODEL IN RATS

P.D. Kolesnichenko¹, O.V. Scheblykina¹, N.I. Nesterova^{1,2}, D.V. Scheblykin¹, A.V. Nesterov¹, M.V. Pokrovskiy¹, M.A. Zhuchenko³, A.V. Tverskoy¹, K.M. Reznikov⁴

¹Belgorod State National Research University
85, Pobeda St., Belgorod, Russia, 308015

²Belgorod Bureau of Forensic Medical Examination
159, Volchanskaya St., Belgorod, Russia, 308017

³State Pharmaceutical Foundation of officinal medicines "PHARMAPARK"
8 (Bld. 1), Nauchny proezd, Moscow, Russia, 117246

⁴Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko
10, Studencheskaya St., Voronezh, Russia, 394036

E-mail: farpavel@narod.ru

Received 10 December 2019

Review (1) 20 April 2020

Review (2) 15 May 2020

Accepted 05 July 2020

The correction of free radical oxidation processes is one of the most promising strategies of neuroprotection in acute cerebrovascular disorders.

The aim of the study is an experimental study of the neuroprotective effects of 3-hydroxypyridine and erythropoietin derivatives, as well as their combined use.

Materials and methods. The study was performed on 109 male Wistar rats. The neuroprotective effect of the substances was studied on a hemorrhagic stroke model. The study drugs were administered to the animals intraperitoneally. Carbamylated darbepoetin was administered three times in advance at the dose of 100 µg/kg within intervals of 3 days, the last injection took place 1 hour before the operation (the total dose was 300 mg/kg). Etoxidol was administered once 1 hour before the surgery at the dose of 50 mg/kg. The survival rate, behavioral features and the state of the animals on the 1st, 3rd, 7th and 14th days were recorded, and the morphological assessment of the brain was carried out.

Results. The investigated substances had a positive effect on both the survival rate of the animals during the first day and on the 14th day. The best survival rates on the 14th day were recorded in the group of a combined use of ethoxydol and carbamylated darbepoetin (75%). Thus, in this group of rats, a faster recovery of neurological disorders was already distinguished from the first day on. By the 7th day, more than 50% of the rats receiving the combination of the studied drugs, had had a slight neurological deficit (up to 3 points on the McGrow scale); by the 14th day there had been only minor changes in the neurological status in the rats of this group. A pronounced neuroprotective effect of the combination of 3-hydroxypyridine and erythropoietin derivatives has been confirmed by a histological examination of brain slices – a more rapid decrease in the size of perifocal edema and microcirculation disorders, less damage to neurons and glial elements, and faster processes of resorption and organization of hemorrhage. A macroscopic examination of the brain sections stained with triphenyltetrazolium chloride of the dying rats, showed that perifocal necrosis had been the main cause of high mortality in the control group after the 3rd day.

Conclusion. As a result of the experiment, the nephroprotective effect of the studied derivatives of 3-hydroxypyridine and erythropoietin has been proved. Moreover, the combination of these drugs has shown a greater neuroprotective activity than their isolated use. The additive effect of these drugs was due to their action mechanism resulting from the synergism of various structures and components of the cells.

Keywords: hemorrhagic stroke, 3-hydroxypyridines, carbamylated darbepoetin, neuroprotection

ВВЕДЕНИЕ

Значение инсульта как медицинской и социальной проблемы с каждым годом возрастает во всем мире, что связано с увеличением среднего возраста населения, а также с увеличением числа людей с факторами риска cerebrovasкулярных заболеваний и сердечно-сосудистой системы.

В настоящее время для профилактики и лечения cerebrovasкулярных заболеваний широко применяются лекарственные препараты и новые соединения так называемого нейропротективного действия, в основе которого лежат разнообразные механизмы, включающие антиоксидантный, антигипоксический, антиапоптотический и другие эффекты.

В клинической практике в терапии цереброваскулярных заболеваний широко применяются антиоксидантные препараты на основе 3-гидроксипиридина, например мексидол, этоксидол, эмоксипин; так как они ингибируют процессы перекисного окисления липидов, повышают активность антиоксидантных ферментов, за счет чего модулируется активность рецепторов и мембраносвязанных ферментов [1].

Однако, несмотря на достижения современной нейрофармакологии, наблюдается рост числа больных с данной патологией, их высокая летальность (50–70% больных) [2] и инвалидизация (примерно 2/3 больных) [3]. Вопросы медикаментозной поддержки больных с острым нарушением мозгового кровообращения остаются важнейшей проблемой современной фармакологии и неврологии.

Уже несколько десятилетий накапливаются экспериментальные данные, подтверждающие высокий нейротекторный потенциал эритропозтина. Его молекула наиболее известна, как положительный регулятор эритропозза, который вырабатывается преимущественно в почках в ответ на снижение парциального давления кислорода. Однако, спектр физиологических эффектов эритропозтина довольно широк и позволяет рассматривать его, как агент с универсальной цитопротекторной направленностью. Запускаемые ими метаболические каскады метаболических процессов приводят к повышению устойчивости клеток к повреждению, что объединяют в понятие «негематопозитических эффектов эритропозтина» [4]. При ишемических поражениях разных органов эритропозтин обуславливает ангиогенное, антиоксидантное, противовоспалительное и антиапоптотическое действие [5], что приводит к уменьшению объема повреждения. В то же время, ввиду активации большого количества вторичных посредников эритропозтин способен обуславливать развитие таких негативных эффектов, как увеличение продукции эндотелина, повышение концентрации тканевого ренина, изменение баланса простагландинов сосудистой ткани, стимуляция ангиогенеза и пролиферация клеток гладких мышц сосудов [6, 7]. Карбамилированный дарбэпозтин принципиально отличается от препаратов на основе эритропозтина, сочетая в себе лучшие качества препаратов предыдущих поколений [8, 9].

ЦЕЛЬЮ данного исследования является изучение терапевтической эффективности производных 3-гидроксипиридина и эритропозтина, а также их комбинаций при моделировании внутричерепной гематомы у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соответствие правилам организации проведения лабораторных исследований

Исследование проведено в соответствии с утвержденными правилами лабораторной практики Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГОСТ 51000.3-96 и 51000.4-96) от 19 июня 2003

года № 267 «О надлежащих правилах лабораторной практики», заключение локального этического комитета № 6 от 05.10.2018.

Дизайн исследования

Самцы крыс линии Вистар массой 200–250 граммов были распределены на несколько групп: 1 – ложно оперированные крысы (10 животных), которых наркотизировали, затем проводили скальпирование и трепанацию черепа, но не осуществляли деструкцию мозговой ткани; 2 – животные с геморрагическим инсультом, не получающие лекарственных препаратов (контрольная группа, 23 крысы); 3 группа – животные с геморрагическим инсультом, которым вводили этоксидол (23 крысы); 4 – животные с моделированной патологией, которые получали карбамилированный дарбэпозтин (20 крыс), 5 – крысы с геморрагическим инсультом, получавшие карбамилированный дарбэпозтин и этоксидол (23 крысы).

Методика моделирования геморрагического инсульта

Острый геморрагический инсульт моделировали в области внутренней капсулы правого полушария, согласно методике А.Н. Макаренко и соавторов [10] в авторской модификации, которая была разработана, реализована и защищена авторским свидетельством [11]. Операция выполнялась в условиях общей анестезии. После премедикации препаратом «Хула» в дозе 0,1 мл крысам в качестве базисного наркоза внутривенно вводился хлоралгидрат в дозе 300 мг/кг. По достижению глубокого наркоза проводился забор крови с помощью шприца из хвостовой вены крысы. Затем проводилась обработка операционного поля, линейный разрез кожи головы в теменной области. Разрез выполнялся во фронтальной плоскости, с последующим проведением гемостаза. Длина разреза составляла 1,5 см. В дальнейшем выполнялось скелетирование кости, отделение надкостницы. С помощью стоматологического бора накладывалось трепанационное отверстие в правой теменной области. Диаметр трепанационного отверстия составлял 3 мм. Далее, с помощью устройства для стереотаксического введения, вводилась пункционная игла в области внутренней капсулы (координаты Н=4 мм, L=3,1 мм, А=1,5 мм от брегмы по атласу G. Paxinos) на глубину 3,0 мм. Затем устройство фиксировалось, и внутрь иглы вводился мандрен-нож, осуществлялась деструкция мозговой ткани (мандрен-нож проворачивался в три оборота почасовой и в три оборота против часовой стрелки). Мандрен-нож извлекался и в стерильных условиях крысе вводилась аутокровь, взятая из хвостовой вены животного, в объеме 0,11 мл на 100 г веса. Введение крови осуществлялось струйно. Эффективность введения определялась по наличию стволых судорог. После чего пунк-

ционная игла извлекалась, рана осушалась, производился контроль гемостаза и послойное ушивание раны. Ложно оперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа.

Исследуемые препараты вводились животным внутрибрюшинно. Карбамилированный дарбэпоэтин, ООО «Фармстандарт», Россия, вводился предварительно трехкратно в дозе 100 мкг/кг с интервалом 3 дня (суммарная доза 300 мкг/кг), последнее введение за 1 час до операции. Производное 3-гидрокси-пиридина этоксиол, ОАО «Синтез», Россия, вводился однократно за 1 час до операции в дозе 50 мг/кг (согласно межвидовому коэффициенту пересчёта средней терапевтической дозы для человека). Контрольным животным вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме.

Влияние препаратов на выживаемость животных

Наблюдения проводились в течение 14 дней после операции на 1, 3, 7 и 14-е сутки. Изучались характеристики поведения и состояния животных на 1, 3, 7 и 14-е сутки.

Исследование неврологического статуса

Для оценки нарушения поведения и состояния животных после геморрагического инсульта использовали комплекс методов, традиционно применяемых для этих целей в эксперименте. Для оценки неврологического статуса использовали метод оценки неврологического дефицита по шкале оценки инсульта McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной (1996) [12]. Для оценки мышечного тонуса путём измерения силы хвата конечностей нами был разработан динамометрический программно-аппаратный комплекс.

При оценке неврологического статуса по шкале оценки инсульта McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной (с легкими симптомами – до 3 баллов) – провисающие движения, слабость конечностей, односторонние полупрозрачные, тремор, маневрирующие движения; и при тяжелых проявлениях неврологических расстройств (от 3,5 до 10 баллов) – парезах и параличах конечностей, а также боковом положении и угнетении сознания.

Измерение силы животных в хватательной пробе осуществлялось при помощи динамометра. В качестве критерия сравнения определялась относительная величина (удельная сила), вычисляемая путём деления максимальной силы хвата на массу тела крысы.

С целью оценки ориентировочно-исследовательского поведения использовалась платформа для изучения двигательной активности лабораторных животных АСТИ-TRACK (PANLAB HARVARD APPARATS). Тестирование крысы осуществлялось в течение 5 минут в инфракрасном мониторе активности до создания патологии, а также на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования геморрагического инсульта.

Морфологическое исследование

Для макроскопического подтверждения повторяемости результатов, верификации локализации геморрагического очага и степени повреждения по 3 головных мозга крысы из 2, 3 и 5-й групп на 4-е сутки исследовали НАДН-дегидрогеназную активность по общепринятому методу окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолием хлористым (ТТХ). Мозг животных извлекался, разрезался на 2 фронтальных среза через место входа мандрен-ножа в ткань мозга. Окрашивание проводили в 1% растворе ТТХ (Sigma Aldrich) 30 мин в термостате при 37 °С. Затем проводили фотографирование и макроскопическую оценку срезов.

Для гистологической оценки мозга животных выводили из эксперимента через 24 часа, 7 и 14 суток после начала исследования. Описание и оценку последствий геморрагического инсульта проводили по рекомендациям атласа гистопатологий нервной системы [13]. Крыс декапитировали, забирали головной мозг, фиксировали его в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24–48 часов и заливали в парафин. Фронтальные гистологические срезы головного мозга толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. В исследовании были использованы микроскоп «МИКМЕД-6» с бинокулярной насадкой, электрической подсветкой, с цифровой камерой МС-5 и компьютер с программным обеспечением «MCview».

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи STATISTICA 10.0 и Microsoft Excel 2016. После оценки нормальности распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка вычисляли средние арифметические, 95% доверительные интервалы (при параметрическом распределении) и квартильный размах (при непараметрическом распределении). Для оценки достоверности межгрупповых различий при нормальном распределении использовали критерий Стьюдента, при распределении отличном от нормального – критерий Манна-Уитни. Для оценки выживаемости использовали процедуру построения кривых дожития, различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние препаратов на выживаемость животных

Во время операции и в течение 1-х суток после нее в контрольной группе погибло 50% крыс с геморрагическим инсультом. Через 1 день 50% крыс с геморрагическим инсультом умерли в контрольной группе. В группе животных, получавших исследуемые вещества, смертность в течение 1-го дня была ниже, чем в контроле (рис. 1). В частности, в группах крыс, получавших карбамилированный дарбэпоэтин или этоксиол, суточная выживаемость составляла 70%. В группе комбинированного применения карбамилированного дарбэпоэтина и этоксиола ранняя выживаемость (1 день) составила 90%.

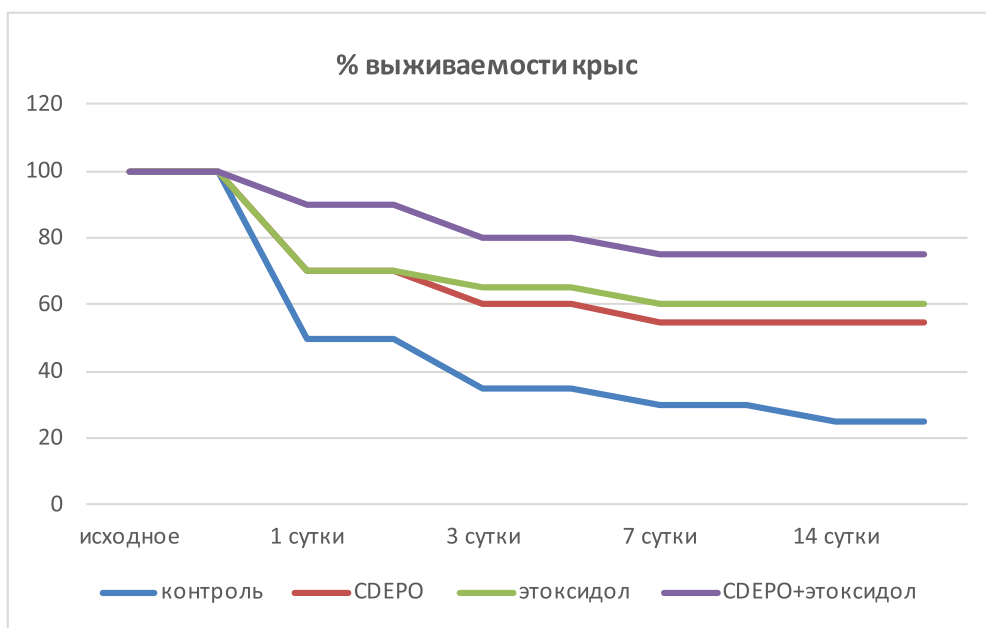


Рисунок 1 – Влияние этoксидола, карбамилированного дарбэпоэтина и их комбинированного применения на показатели выживаемости животных на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования геморрагического инсульта

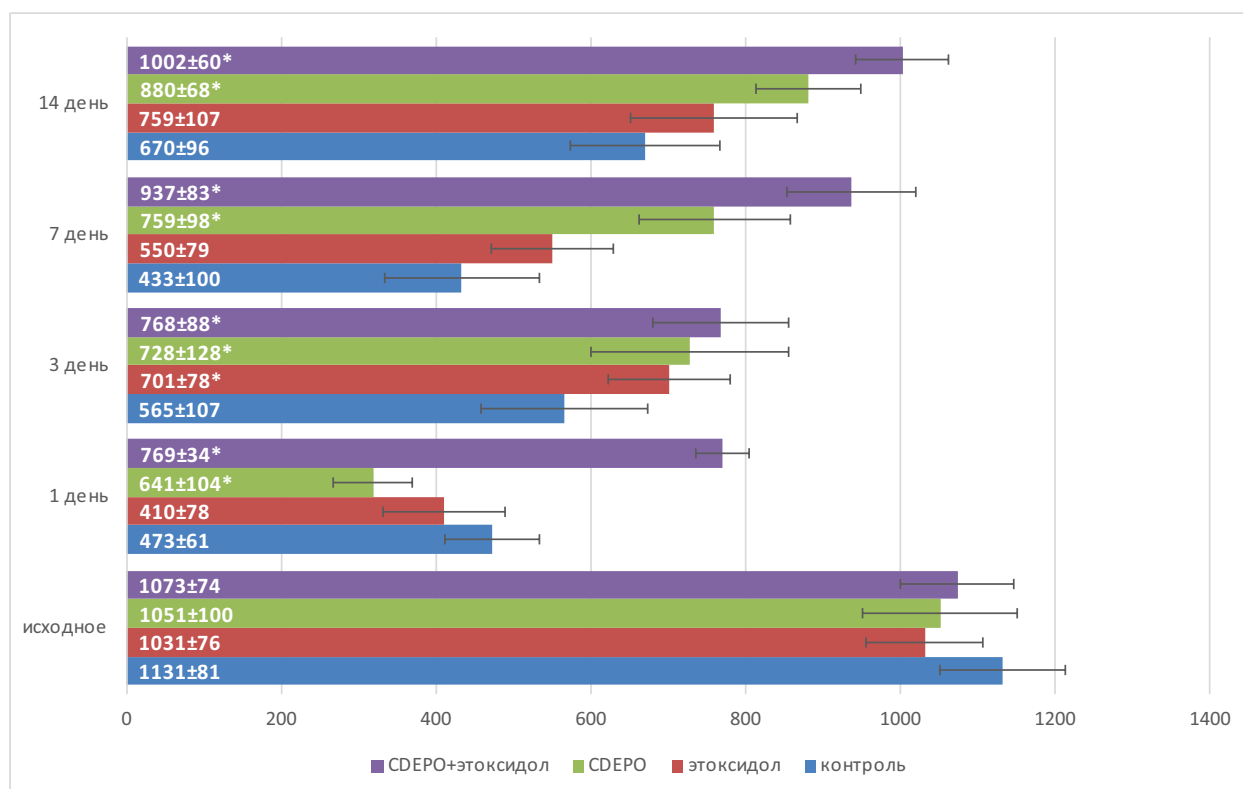


Рисунок 2 – Влияние этoксидола, карбамилированного дарбэпоэтина и их комбинированного применения на показатели общей активности, вычисляемые программой «Acti-Track», на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования геморрагического инсульта

Примечание: *p<0,05 – различия статистически достоверны при сравнении с животными контрольной группы

Особого внимания заслуживает тот факт, что в группах исследуемых веществ после 7-х суток гибели животных не отмечалось.

Все исследуемые вещества более чем на 40% повышали итоговую (14-суточную) выживаемость по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Наилучшие показатели выживаемости на 14-е сутки зафиксированы в группе комбинированного применения этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина – итоговая выживаемость животных этой группы составила 75%.

В группе ложнооперированных животных в течение всего времени наблюдения смертельных исходов не зафиксировано.

Оценка неврологического дефицита по шкале McGrow

На первый день после операции почти у всех крыс наблюдались выраженные неврологические нарушения в виде круговых движений, парезов и параличей

конечностей (табл. 1). В группе ложнооперированных крыс серьезных неврологических изменений не наблюдалось, только у 31% животных этой группы установлена вялость и замедленное движение.

Крысы, получавшие исследуемые вещества, в течение всего времени наблюдения имели статистически достоверный менее выраженный неврологический дефицит по сравнению с группой контроля.

Группа крыс, получавших комбинацию препаратов этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина, уже с первых суток отличалась более быстрым восстановлением неврологических нарушений. К 7-м суткам более 50% крыс, получавших комбинацию исследуемых препаратов, имели легкий неврологический дефицит (до 3 баллов по шкале McGrow) в виде замедленности движений, слабости конечностей, одностороннего полуптоза и маневжных движений. К 14-м суткам у крыс этой группы наблюдался лишь незначительные изменения в неврологическом статусе – $1,1 \pm 0,5$ по шкале инсульта McGrow.

Исследование неврологического статуса

Таблица 1 – Влияние этоксида, карбамилированного дарбэпоэтина и их комбинированного применения на показатели неврологического статуса на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования геморрагического инсульта

До моделирования патологии				
	контроль	этоксидол	CDEPO	CDEPO +этоксидол
удельная сила	$7,0 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,3$
McGrow	0	0	0	0
1-е сутки				
	контроль	этоксидол	CDEPO	CDEPO +этоксидол
удельная сила	$2,7 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2^*$	$3,1 \pm 0,1^*$
McGrow	$8,1 \pm 2,0$	$6,7 \pm 2,4^*$	$7,2 \pm 2,0$	$5,6 \pm 1,8^*$
3-и сутки				
	контроль	этоксидол	CDEPO	CDEPO +этоксидол
удельная сила	$4,0 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,2^*$	$5,1 \pm 0,3^*$
McGrow	$6,4 \pm 2,6$	$4,3 \pm 1,8^*$	$4,2 \pm 2,5^*$	$3,9 \pm 2,4^*$
7-е сутки				
	контроль	этоксидол	CDEPO	CDEPO +этоксидол
удельная сила	$4,5 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,5$
McGrow	$5,4 \pm 2,1$	$3,3 \pm 2,1^*$	$3,2 \pm 2,2^*$	$2,9 \pm 1,9^*$
14-е сутки				
	контроль	этоксидол	CDEPO	CDEPO +этоксидол
удельная сила	$4,7 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,5^*$
McGrow	$5,0 \pm 2,5$	$3,0 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,6^*$	$1,1 \pm 0,5^*$

Примечание: * $p < 0,05$ – различия статистически достоверны при сравнении с животными контрольной группы

Исследования мышечного тонуса

Исследование силы хвата лап крыс выявило, что в первые сутки после инсульта мышечный тонус в контрольной группе и в группе, получавшей карбамилированный дарбэпоэтин, существенно не отличаются и составляют в среднем 56% (табл. 1). На фоне введения этоксида снижение мышечного тонуса за 1-й день составило 38,3%, что было значительно меньше, чем в контрольной группе. Самое большое снижение мышеч-

ного тонуса наблюдалось в группе крыс, получавших комбинацию изученных препаратов, и составило 27,4%. На 3-и сутки отмечался прирост мышечной силы во всех группах, причём в группах, получавших исследуемые вещества, прирост оказался достоверно выше, чем в контрольной группе. На 7-е и 14-е сутки статистически значимое возрастание мышечной силы было только при введении карбамилированного дарбэпоэтина и комбинации карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида.

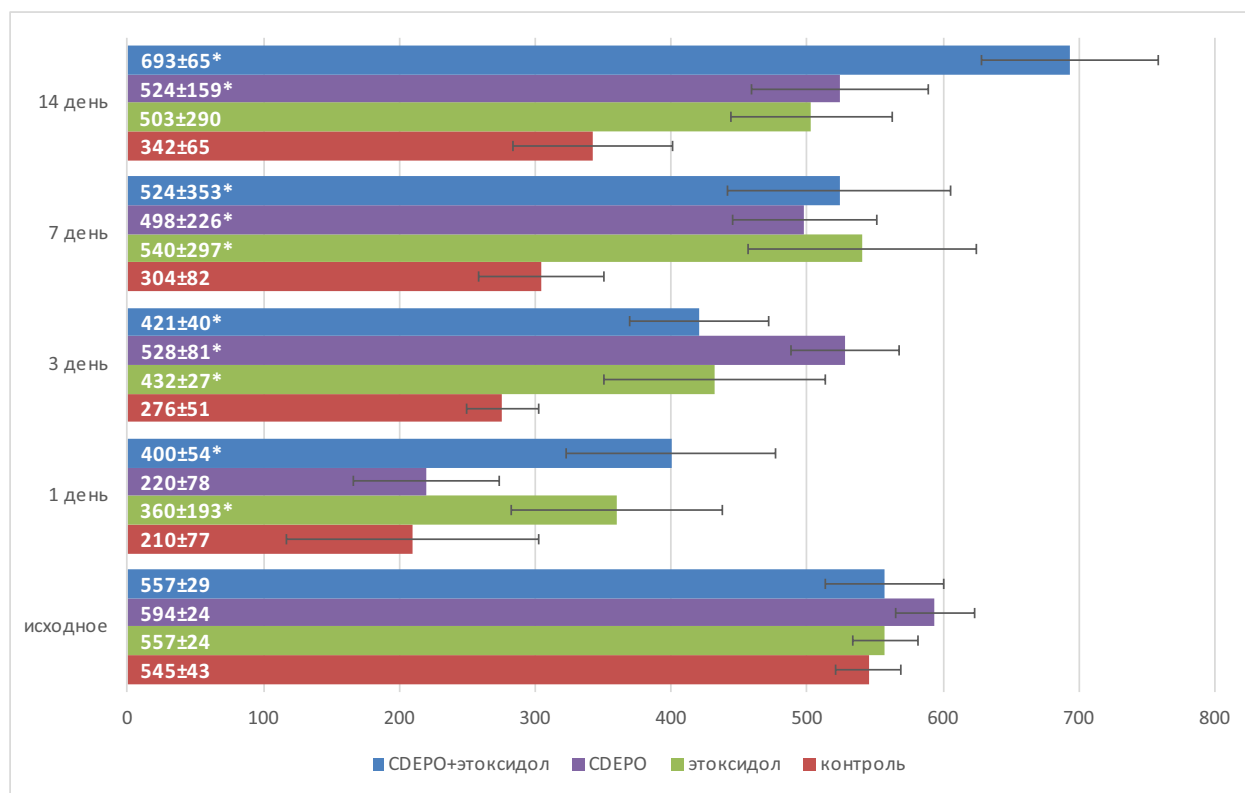


Рисунок 3 – Влияние этоксида, карбамилированного дарбэпоэтина и их комбинированного применения на показатели общей дистанции, вычисляемые программой «Acti-Track», на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования геморрагического инсульта

Примечание: * $p < 0,05$ – различия статистически достоверны при сравнении с животными контрольной группы

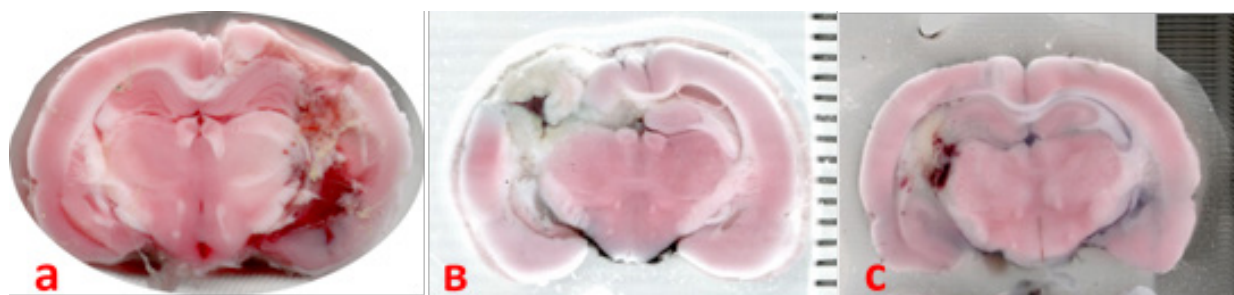


Рисунок 4 – Эффективность аддитивного нейропротекторного действия карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида при моделировании геморрагического инсульта у крыс.

Макроскопический снимок окрашенных трифенилтетразолием хлористым срезов мозга

Примечание: А. Срез мозга умирающей крысы контрольной группы на 1-е сутки. В. Срез мозга умирающей крысы из группы контроль на 5-е сутки. С. Срез мозга умирающей крысы из группы CDEPO+этоксидол

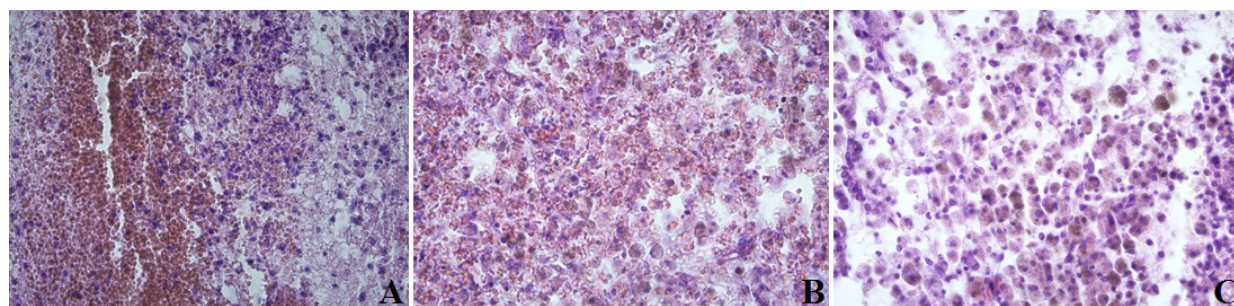


Рисунок 5 – Ткань головного мозга крысы в области гематомы

Примечание: А – контрольная группа на 1-е сутки; В – контрольная группа на 7-е сутки; С – контрольная группа на 14-е сутки. Окрашивание: гематоксилин и эозин; $\times 400$

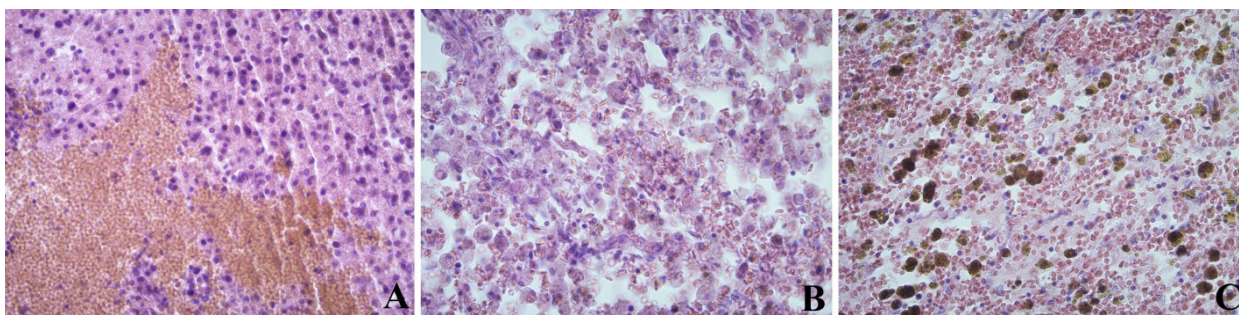


Рисунок 6 – Ткань головного мозга крыс в области гематомы, получавших этоксидол

Примечание: А – на 1-е сутки; В – на 7-е сутки; С – на 14-е сутки. Окрашивание: гематоксилин и эозин; $\times 400$

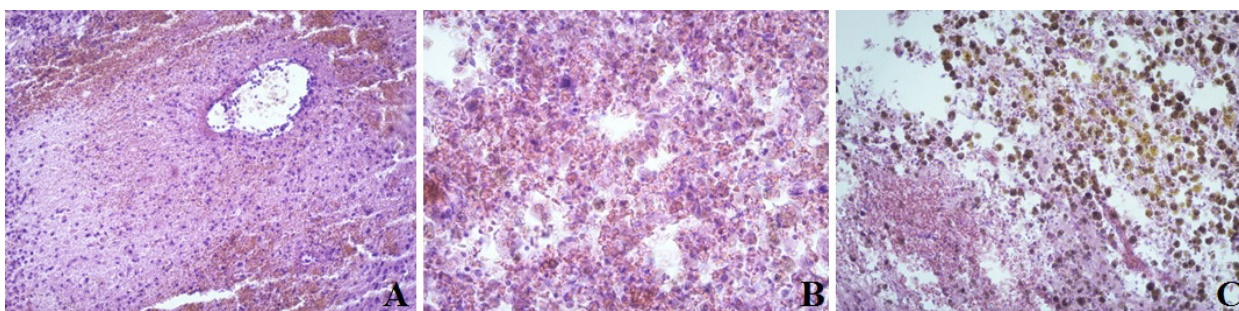


Рисунок 7 – Ткань головного мозга крыс в области гематомы, получавших карбамилированный дарбэпозтин

Примечание: А – на 1-е сутки; В – на 7-е сутки; С – на 14-е сутки. Окрашивание: гематоксилин и эозин; $\times 400$

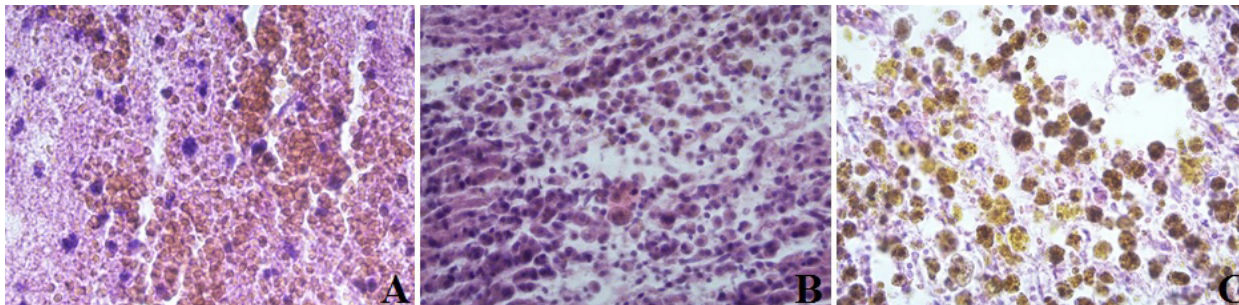


Рисунок 8 – Ткань головного мозга крыс в области гематомы, получавших комбинацию карбамилированного дарбэпозтина и этоксида

Примечание: А – на 1-е сутки; В – на 7-е сутки; С – на 14-е сутки. Окрашивание: гематоксилин и эозин; $\times 400$

Влияние исследуемых препаратов на двигательную активность животных с геморрагическим инсультом. В течение 1–7-х суток после моделирования геморрагического инсульта показатели общей активности (рис.2), общей дистанции (рис. 3) при воздействии этоксида и комбинации препаратов карбамилированного дарбэпозтина и этоксида были достоверно выше, чем в контрольной группе.

Показатели общей активности и пройденной дистанции крыс, получавших карбамилированный дарбэпозтин, на 1-е сутки значительно уступали результатам животных, получавших этоксидол и комбинацию препаратов и не имели достоверных различий с группой контроля. Однако к 3-м суткам активность животных, получавших карбамилированный дарбэпозтин, нарастала и не имела статистически значи-

мых отличий от групп других исследуемых веществ. Следует отметить, что к 14-м суткам показатели активности животных этой группы даже превышали таковые в группе этоксида, и ненамного уступали группе комбинации препаратов.

Наиболее сильно и быстро показатели общей активности уже с 1-х суток повышала комбинация препаратов, по сравнению с их монотерапией.

Высокие показатели активности контрольной группы на 14-е сутки можно объяснить высокой летальностью в данной группе и выживаемостью лишь наиболее сильных особей с высоким регенераторным потенциалом.

Морфологическое исследование

Для макроскопического подтверждения по-

вторяемости результатов и адекватности методики клиническим случаям геморрагического инсульта проведено исследование мозга умирающих на 1 и 4–5 сутки путём окрашивания срезов мозга 2,3,5-трифенилтеразолием хлористым (рис. 4).

Макроскопическая оценка подтвердила адекватность применения нейропротективной терапии в модели геморрагического инсульта (рис.4). Очевидно, что причины смертности на 1-е сутки были связаны как с непосредственным воздействием введённой в ткань мозга крови, так и с дислокационными осложнениями, однако начиная с 4-х суток смертность обусловлена массивным перифокальным некрозом.

Микроскопическое исследование случайно выбранных в каждой группе крыс показало следующее. У животных контрольной группы на 1-е сутки после моделирования внутримозгового кровоизлияния по периферии гематомы выявлялся выраженный отек, нарушение гистоархитектоники слоев нейронов коры, выраженные ишемические изменения, кариолизис нейронов, умеренно выраженная перифокальная лейкоцитарная реакция и менее выраженная глиальная реакция (рис. 5A). Отмечается полиморфизм нейронов: набухание тел нейронов, ядра нейронов деформированы, базофильны, ядрышки смещены к периферии, деформированы. Местами ядро и ядрышки почти или совершенно неразличимы. Кариолизис нейронов, умеренно выраженная перифокальная лейкоцитарная реакция и менее выраженная глиальная реакция (рис. 5A). На 7-е сутки, умеренно выраженная перифокальная лейкоцитарная реакция сменилась на умеренно выраженную глиальную и макрофагальную реакцию с примесью единичных гемосидерофагов (рис. 5B). На 14-е сутки умеренно выраженная глиальная и макрофагальная реакция сохраняется, количество гемосидерофагов незначительно увеличилось (рис. 5C).

При анализе группы с использованием препарата этоксидол перифокальный отек менее выражен по сравнению с контрольной группой (рис. 6A) и группой карбамилированного дарбэпоэтина (рис. 7A), но более выражен, чем в группе комбинированного применения карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида (рис. 8A). У животных, получавших карбамилированный дарбэпоэтин и комбинацию препаратов, были более ярко выражены признаки воспалительной реакции с развитием лейкоцитарной инфильтрации. В тоже время, ее выраженность не достигала той степени интенсивности, которая отмечалась в контрольной группе. На 7-е сутки глиальная и макрофагальная реакция в группах этоксида (рис. 6B) и карбамилированного дарбэпоэтина (рис. 7B) опережала контрольную группу, а в группе комбинированного применения карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида (рис. 8B) выявлялись более выраженные процессы резорбции в виде скопления немногочисленных макрофагов с внутриклеточным скоплением кровяного пигмента (гемосидерофаги). На 14-е сутки процессы резорбции в группах этоксида (рис. 6C) и

карбамилированного дарбэпоэтина (рис. 7C) опережали контрольную группу, но признаки резорбции и организации в группе комбинированного применения карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида (рис. 8C) более выражены в виде скопления многочисленных гемосидерофагов с внутриклеточным скоплением кровяного пигмента (гемосидерофаги) и внеклеточным скоплением кровяного пигмента.

Таким образом, по данным гистологического исследования, одновременное введение комбинации карбамилированного дарбэпоэтина и этоксида приводит к ускорению регресса перифокального отёка и восстановлению микроциркуляции, снижению количества повреждённых нейронов и глиальных элементов, ускорению процессов резорбции и организации очага кровоизлияния.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования подтверждают наличие нейропротективных свойств у всех исследуемых веществ. Однако нейропротективная активность карбамилированного дарбэпоэтина развивалась более медленно – к 3-м суткам, в отличие от этоксида и комбинации этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина, у которых церебропротективные свойства отмечались уже на 1-е сутки (меньшая выраженность неврологических нарушений и большая активность животных данных групп в инфракрасном мониторе).

Комбинация этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина обладает более выраженными нейропротективными свойствами, нежели изолированное их применение, проявляющаяся более высокими показателями выживаемости животных данной группы, значительным уменьшением выраженности постинсультных нарушений уже с первых суток, а также при гистологическом исследовании срезов головного мозга.

Аддитивное действие данных препаратов обуславливается их механизмом действия. Предположительный синергизм достигается за счет воздействия на различные структуры и компоненты клетки.

Этоксидол относится к числу ингибиторов свободнорадикальных процессов. Присутствие 3-гидроксипиридина в молекуле этоксида обеспечивает его спектр антиоксидантных и мембранопротективных эффектов, а описанные у ряда авторов явления уменьшения эксайтотоксичности глутамата, модулирование чувствительности рецепторов, мембраносвязанных ферментов (умано-стераза, аденилатциклаза), ингибирование свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов приводит к поливалентности нейропротективного эффекта [14].

Малат, входящий в состав этоксида, проникает через гематоэнцефалический барьер. Затем он метаболизируется с образованием аденозинтрифосфата. Это происходит даже во время гипоксии, что помогает нервным клеткам пережить отсутствие кислорода. При этом малат может превращаться в fumarat и даже succinat. В зависимости от глубины ишемии и энергетического дефицита малат может превращать-

ся с образованием АТФ в условиях ограниченного количества кислорода в клетке или может восстанавливаться до сукцината «в резерв». Исследователями было установлено, что клетка не расходует АТФ-энергию на транспорт малата в митохондрии, а использует специальный малат-аспартатный челнок. Была продемонстрирована способность малата увеличивать дыхательный коэффициент митохондрий и восстанавливать цитохром b5 в присутствии никотинамидадениндинуклеотида, кофермента, участвующего в окислительно-восстановительных реакциях [15–17].

Кроветворные функции эритропоэтина обусловлены его влиянием на центральную нервную систему. Рецепторы эритропоэтина экспрессируются на поверхности нейронов [17, 18]. При различных повреждениях ЦНС наблюдается синтез астроцитами эритропоэтина, имеющий нейропротективное действие [19–21], игибируя апоптоз, он стимулирует пролиферацию нейронов и ангиогенез.

Карбамилированный дарбэпоэтин, гипергликозилированный вариант рекомбинантного эритропоэтина человека, обладает менее выраженными гемопоэтическими свойствами нежели базисная молекула за счет гетеродимерному рецептору EpoR/CD131, чем к гомодимерному рецептору EpoR/EpoR [22]. При связывании молекулы карбамилированный дарбэпоэтин, так же как и эритропоэтина, с рецептором EpoR запускается каскад реакций фосфорилирования ключевых белков, таких как Ras-митогенактивирующая протеинкиназа, Янус-киназа-2 и др., которые, в свою очередь, активируют экспрессию генов семейства bcl-xL и синтез антиапоптотических белков, подавляющих апоптотическую гибель клеток [23, 24].

Однако, благодаря карбамилированию первичных аминов белка и аминокислотных остатков лизина белка в N-концевой области, не затрагивая профиль гликозилирования целой молекулы, карбамилированный дарбэпоэтин не взаимодействует с классическим эритропоэтиновым рецептором (не стимулирует пролиферацию клеток линии TF1), и не

обладает рядом побочных нежелательных эффектов, таких как повышение артериального давления и риск образования тромбов, что, в случае цереброваскулярных заболеваний, категорически противопоказано [25–27].

Полученные результаты определяют возможность дальнейшего изучения нейропротективных эффектов комбинации этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина, и возможного будущего её внедрения в клиническую практику для лечения и профилактики цереброваскулярных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые производные 3-гидроксипиридина и эритропоэтина человека обладают нейропротективным действием, что проявляется в наименьшей выраженности неврологических нарушений и более быстрым уменьшением признаков нейродегенерации, ускоренными процессами организации кровоизлияния.

Нейропротективная активность карбамилированного дарбэпоэтина развивалась более медленно – к 3-м суткам, в отличие от этоксида и комбинации этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина, у которых церебропротективные свойства отмечались уже на 1-е сутки.

Комбинация этоксида и карбамилированного дарбэпоэтина обладает более выраженными нейропротективными свойствами, которые проявляются значительным уменьшением выраженности постинсультных нарушений. Эти различия заметны уже к 1-му дню заболевания, что подтверждается более высокой выживаемостью после моделирования патологии, активностью животных данной группы, а также гистологическим исследованием срезов мозга – более быстрым уменьшением перифокального отека и нарушений микроциркуляции, меньшим повреждением нейронов и глиальных элементов и более быстрыми процессами резорбции и организации кровоизлияния.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

П.Д. Колесниченко – работа над концепцией и дизайном исследования, реализация эксперимента, обработка результатов, написание текста; О.В. Щерблыкина – статистическая обработка результатов, редактирование; Н.И. Нестерова – сбор и обработка морфологического материала, полуколичественный морфологический анализ; Д.В. Щерблыкин – сбор и обработка материала, реализация эксперимента; А.В. Нестеров – доработка экспериментальной модели, работа над концепцией и дизайном исследования, реализация эксперимента, морфологическое исследование; М.В. Покровский – работа над концепцией и дизайном исследования, административная организация экспериментальной работы; М.А. Жученко – работа над концепцией исследования, производство карбамилированной формы дарбэпоэтина; А.В. Тверской – редактирование морфологического исследования экспериментального материала; К.М. Резников – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Kesarev O.G., Danilenko L.M., Pokrovskii M.V., Timokhina A.S., Khavanskii A.V. Study of dose-dependent effect of 2-ethyl-6-methyl-3 hydroxypyridine succinate on the contractile function of isolated rat heart // *Research Result in Pharmacology*. 2017. Vol. 3. No1. P. 3–9. DOI: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-3-9.
- Скворцова В.И., Чазова И.Е., Стаховская Л.В. Вторичная профилактика инсульта. – М.: ПАГРИ, –2002. 120 с.
- Karpov S.M., Dolgova I.N., Vishlova I.A. The main issues of topical diagnosis of nervous system diseases. Stavropol. Stavropol State Medical University. 2015. P. 120.
- Reznikov K.M., Gorbunova N.S., Kolesnichenko P.D., Tverskoy A.V., Kostina D.A., Bashkatova D.A., Nikitina V.A. Search of new pharmaceuticals on the basis of darbepoetin in the treatment of ischemic stroke (review of literature) // *Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology*. 2017. Vol. 3. No1. P. 125–136. DOI: 10.18413/2500-235X-2017-3-1-125-136.
- Zhu L., Bai X., Wang S., Hu Y, Wang T., Qian L., Jiang L. Recombinant human erythropoietin augments angiogenic responses in a neonatal rat model of cerebral unilateral hypoxia-ischemia // *Neonatology*. 2014. Vol. 106. No2. P. 143–148. DOI: 10.1159/000362262.
- Fisher J.W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update // *Experimental Biology and Medicine* (Maywood). 2003. Vol. 228. No1. P. 1–14. DOI: 10.1177/153537020322800101.
- Shabelnikova AS, Peresyphkina AA, Pokrovskiy MV, Kashuba AS, Ntrebenko AS (2014) Analysis of the protective properties of erythropoietin and nicorandil on the basis of the model of the retina ischemia/reperfusion. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(6), 1335–1339. DOI: 10.13140/RG.2.1.4540.8880
- Catlin D.H., A. Breidbach, Elliott S., Glaspy J. Comparison of darbepoetin alfa, recombinant human erythropoietin, and endogenous erythropoietin from human urine // *Clinical Chemistry*. 2002. Vol. 48. No11. P. 2057–2059. DOI: 10.1093/clinchem/48.11.2057.
- Korokin M.V., Soldatov V.O., Tietze A.A., Golubev M.V., Belykh A.E., Kubekina M.V., Puchenkova O.A., Denisjuk T.A., Gureyev V.V., Pokrovskaya T.G., Gudyrev O.S., Zhuchenko M.A., Zatolokina M.A., Pokrovskiy M.V. (2019) 11-amino acid peptide imitating the structure of erythropoietin α -helix b improves endothelial function, but stimulates thrombosis in rats. *Pharmacy & Pharmacology*;7(6):312–320. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-312-320.
- Makarenko A.N., Kositsin N.S., Pasikova N.V., Svinov V.V. Simulation of local cerebral hemorrhage in different brain structures of experimental animals // *Journal of Higher Nervous Activity*. 2002. Vol. 52. No6. P. 765–768.
- Патент 2721289. Российская Федерация, МПК G09B 23/28. Способ моделирования геморрагического инсульта у крыс / Нестеров А.В., Колесниченко П.Д., Покровский М.В., Нестерова Н.И., Марковская В.А., Иванова М.И., Карагодина А.Ю., Сапарбоева Н.М., Мурашев Б.В., Прошин А.Ю., Патраханов Е.А., Архипов И.С., Покровский В.М.; заявитель и патентообладатель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») – № 2019134892; заявл. 30.10.2019; опубл. 18.05.2020.
- Gannushkina I.V. The pathophysiological mechanisms of disorders of cerebral circulation and the new directions in their prevention and treatment // *Journal. Neuropatol. and psychiatrist*. 1996. Vol. 1. P. 14–18.
- Ермохин П.Н. Гистопатология центральной нервной системы: атлас микрофотографий // П.Н. Ермохин; под ред. А. П. Авцына. – Москва: Медицина, 1969. 243 с.
- Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. – М.: Медицина, 1995. 65 с.
- Peresyphkina A, Pazhinsky A, Pokrovskii M, Beskhnelnitsyna E, Pobeda A, Korokin M. Correction of experimental retinal ischemia by l-isomer of ethylmethylhydroxypyridine malate // *Antioxidants*. 2019 Vol. 8. No2. P. 34. DOI: 10.3390/antiox8020034.
- Kolesnichenko P.D., Reznikov K.M., Zhernakova N.I., Stepchenko A.A., Popova I.A. The Value Changes Redox System the Body Fluid Media for Life Processes and the Action of Drugs // *Journal of International Pharmaceutical*. 2018. Vol. 45. P. 440–444.
- Ливанов Г.А., Александров М.В., Васильев С.А., Батоцыренова Х.В., Батоцыренов Б.В., Лодягин А.Н., Луцкыч М.А., Носов А.В. Метаболическая десинхронизация при критических состояниях (экспериментальное исследование) // *Общая реаниматология*. 2006. Т. 2, №1. С. 42–46. DOI: 10.15360/1813-9779-2006-1-42-46.
- Sanchis-Gomar F., Perez-Quilis C., Lippi G. Erythropoietin Receptor (EpoR) Agonism Is Used to Treat a Wide Range of Disease // *Molecular Medicine*. 2013. Vol. 19. No1. P. 62–64. DOI: 10.2119/molmed.2013.00025.
- Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2014. Т. 77. №9. С. 8–12. DOI: 10.30906/0869-2092-2014-77-9-8-12.
- Celik M., Gokmen N., Erbayraktar S., Akhisaroglu M., Konak S., Ulukus C., Genc S., Genc K., Sagiroglu E., Cerami A., Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury // *PNAS*. 2002. Vol. 99. No4. P. 2258–2263. DOI: 10.1073/pnas.042693799.
- Basov A.A., Elkina A.A., Samkov A.A., Volchenko N.N., Moiseev A.V., Fedulova L.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. Influence of deuterium-depleted water on the isotope D/H composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of ontogenesis // *Iranian Biomedical Journal*. 2019. Vol. 23. No2. P. 129–141. DOI: 10.29252/.23.2.129.
- Tverskoy A.V., Kolesnichenko P.D., Shcheblykina O.V., Gorbunova N.S., Morozov V.N., Mukhina T.S. Morphology of the rat's brain in four vessels model of ischemic stroke after administration of carbamylated darbepoetin // *Drug Invention Today*. 2018. Vol. 10. No5. P. 3897–3900.
- Middleton S.A., Barbone F.P., Johnson D.L., Thurmond R.L., You Y., McMahan F.J., Jin R., Livnah O., Tullai J., Farrell F.X., Goldsmith M.A., Wilson I.A., Jolliffe L.K. Shared and unique determinants of the erythropoietin (EPO) receptor are important for binding EPO and EPO mimetic peptide // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274. No20. P. 14163–14169.

24. Kolesnichenko P.D., Dolzhikov A.A., Zhernakova N.I., Shaposhnikov A.A., Stepchenko A.A., Batishcheva G.A., Reznikov K.M. Preclinical study of the allergenic properties of carbamylated darbepoetin // *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 4. No10. P. 3798–3802.
25. Gaudard A., Varlet-Marie E., Bressolle F., Audran M. Drugs for Increasing Oxygen Transport and Their Potential Use in Doping // *Sports Medicine*. 2003. Vol. 33. No.3. P. 187–212.
26. Pozdniakova N.V., Turobov V., Garanina E.E., Ryabaya O.A. Temporal dynamics of cytokines in the blood of rats with experimentally induced autoimmune encephalomyelitis // *Bulletin of RSMU*. 2017. No6. P. 69–77. DOI: 10.24075/brsmu.2017-06-12.
27. Basov A.A., Kozin S.V., Bikov I.M., Popov K.A., Moissev A.V., Elkina A.A., Dzhimak S.S. Changes in Prooxidant-Antioxidant System Indices in the Blood and Brain of Rats with Modelled Acute Hypoxia which Consumed a Deuterium-Depleted Drinking Diet // *Biology Bulletin*. 2019. Vol. 46. No6. P. 531–535. DOI: 10.1134/S1062359019060049.

АВТОРЫ

Колесниченко Павел Дмитриевич – доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-2434-994X. E-mail: farpavel@yandex.ru

Щеблыкина Олеся Викторовна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: sheolvi31@gmail.com

Нестерова Наталья Игоревна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», врач судебно-медицинской экспертизы судебно-гистологического отделения ОГБУЗ «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы». E-mail: sushkova-nesterova@mail.ru.

Щеблыкин Дмитрий Валерьевич – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-2420-2243. E-mail: dmitryshch1@gmail.com

Нестеров Аркадий Витальевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологии, ФГАОУ ВО

«Белгородский государственный национальный исследовательский университет». E-mail: nesterov_a@bsu.edu.ru

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-2761-6249. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Жученко Максим Андреевич – кандидат биологических наук, начальник сектора разработки и доклинических исследований ГЛФ ООО «ФАРМАПАРК». E-mail: maksim.zhuchenko@pharmapark.ru

Тверской Алексей Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-1537-6564. E-mail: tverskoy@bsu.edu.ru

Резников Константин Михайлович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко». E-mail: vrkmf@yandex.ru