

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2014

*И. А. Волчегорский, И. Ю. Мирошниченко, Л. М. Рассохина*

## **ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ОКСИПИРИДИНА И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСТРОЙ АДРЕНАЛИНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ФОРМАЛИНОВОМУ ОТЕКУ У МЫШЕЙ**

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

Проведено сравнительное изучение влияния отечественных производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты (эмоксипина, реамберина и мексидола) на устойчивость мышей к острой адреналиновой интоксикации и формалиновому отеку. Дополнительно были изучены соответствующие эффекты  $\alpha$ -липоевой кислоты ( $\alpha$ -ЛК), которая ранее использовалась как препарат сравнения при оценке антигипоксической активности производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты. Установлено, что однократное введение эмоксипина, реамберина, мексидола и  $\alpha$ -ЛК в оптимальных дозах, соответствующих терапевтическому диапазону для человека, увеличивает продолжительность жизни животных, погибавших от острой адреналиновой интоксикации. Продемонстрировано, что  $\alpha$ -ЛК уменьшает формалиновый отек, а эмоксипин и мексидол увеличивают его выраженность. Показано, что защитный эффект всех использованных препаратов при адреналиновой интоксикации нарастает в прямой зависимости от их способности усиливать формалиновый отёк.

**Ключевые слова:** производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты; адреналиновая интоксикация; формалиновый отек; реамберин.

Оригинальные отечественные препараты эмоксипин, реамберин и мексидол представляют своеобразный ряд производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты, официально зарегистрированных в качестве лекарственных средств (ЛС) и разрешенных для медицинского применения в России. 3-Оксипиридиновые составляющие этого ряда (эмоксипин и мексидол) характеризуются идентичностью катиона (2-этил-6-метил-3-оксипиридин) и различается по аниону, представленному  $\text{Cl}^-$  (для эмоксипина) и сукцинатом (для мексидола). Анионный компонент реамберина представлен сукцинатом, формирующим соль с фармакофором не 3-оксипиридиновой природы (меглумином, N-(1-дезоксид-D-глюцитол-1-ил)-N-метиламмонием). Отмеченные особенности химической структуры позволяют рассматривать мексидол в качестве ЛС, одновременно являющегося производным 3-оксипиридина и сукцината, а эмоксипин и реамберин как относительно изолированные производные 3-оксипиридина и янтарной кислоты соответственно. Эмоксипин, реамберин и мексидол обладают значительным терапевтическим потенциалом, иллюстрирующим целесообразность включения этих ЛС в схемы комплексного лечения социально-значимых и наиболее распространенных заболеваний человека. Об этом свидетельствует эффективность применения производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты при цереброваскулярной и

сердечно-сосудистой патологии, диабетических и компрессионных нейропатиях, абстинентных состояниях, туберкулезе легких и первичной открытоугольной глаукоме [1 – 6]. Высокая клиническая эффективность эмоксипина, реамберина и мексидола при столь различных заболеваниях и синдромах может быть связана со способностью этих ЛС корригировать стрессорную и воспалительную реактивность, имеющую прямое отношение к развитию большинства патологических состояний. Для изучения такой возможности в эксперименте целесообразно использовать тест адреналиновой интоксикации, воспроизводящий эндокринные сдвиги при остром стрессе [7], и формалинового отека, моделирующий острое асептическое воспаление [7]. Представленная статья посвящена сравнительному анализу влияния производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты на устойчивость мышей к острой адреналиновой интоксикации и формалиновому отеку. Дополнительно были изучены соответствующие эффекты  $\alpha$ -липоевой кислоты ( $\alpha$ -ЛК), которая ранее использовалась как препарат сравнения при оценке антигипоксической активности производных 3-оксипиридина и янтарной кислоты [8].

### *Экспериментальная часть*

Исследование включало 2 серии экспериментов и было проведено на 579 половозрелых беспородных

мышьях обоего пола массой 18 – 25 г. Организация работы соответствовала этическим нормам, отражённым в российских и международных нормативно-правовых документах, регламентирующих эксперименты на животных [9]. В обеих экспериментальных сериях изученные ЛС вводили однократно внутривенно за 30 мин до моделирования острой адреналиновой интоксикации (I-я серия) или формалинового отека (II-я серия). Каждое ЛС применяли в 3 дозах, экстраполированных из разовых дозировок терапевтического диапазона для человека с учётом различий в величинах относительной площади поверхности тела [7]. Минимальной дозой изучаемого диапазона являлась 1/2 от расчетного эквивалента средней терапевтической дозы (ЭСТД). В качестве максимальной дозировки использовался удвоенный ЭСТД. Эмоксипин (2-этил-6-метил-3-оксипиридина гидрохлорид, ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия) использовали в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг. Изученные дозы 1,5 % раствора реамберина (N-(1-дезоксид-D-глюцитол-1-ил)-N-метиламмония натрия сукцинат, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Россия) составили 25, 50 и 100 мл/кг. Мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат, ООО “НПК “Фармасофт”, Россия) применяли в дозах 25, 50 и 100 мг/кг. Препарат α-ЛК (берлити-

он; Берлин-Хеми/Менарини Фарма ГмбХ, Германия) применяли в дозах 50, 100 и 200 мг/кг (1/2 ЭСТД, ЭСТД и 2 ЭСТД соответственно). Все дозировки изучаемых ЛС вводили в конечном объеме 100 мл/кг (при необходимости препараты разводили в 0,9 % растворе NaCl). Мыши контрольных групп получали изотонический раствор NaCl в том же объеме.

Моделирование острой адреналиновой интоксикации в I-й серии экспериментов осуществляли с помощью метода [10] в модификации [7]. Мышам подкожно вводили 0,056 % раствор адреналина гидрохлорида в дозе 14 мг/кг. В течение последующих 60 мин оценивали динамику гибели животных. Результат выражали показателями летальности мышей и длительностью жизни животных, погибших в пределах 1 ч с момента введения адреналина.

Для моделирования формалинового отека во II-й серии экспериментов мышам под апоневроз стопы вводили 0,05 мл 3,3 % раствора нейтрального формалина [11]. Через 1 ч после инъекции формалина мышей забивали цервикальной дислокацией, рассекали оба голеностопных сустава, при помощи торсионных весов определяли массу воспаленной и интактной стоп и рассчитывали прирост массы воспаленной стопы в процентах от массы интактной стопы.

#### Влияние эмоксипина, реамберина, мексидола и α-липовой кислоты на устойчивость мышей к острой адреналиновой интоксикации и формалиновому отеку

Группа (доза ЛС)	Острая адреналиновая интоксикация		Выраженность формалинового отека, %
	Летальность	Длительность жизни погибших мышей, мин	
<b>Эмоксипин</b>			
Контроль	19/34 (55,88 %)	29,0 (23,0 – 38,0)	38,0 (31,6 – 53,0) (n = 10)
1/2 ЭСТД (12,5 мг/кг)	17/31 (54,84 %)	49,0* (43,0 – 55,5)	48,9* (46,0 – 56,2) (n = 10)
ЭСТД (25 мг/кг)	19/31 (61,29 %)	43,0* (32,0 – 52,0)	41,2 (34,6 – 43,9) (n = 10)
2 ЭСТД (50 мг/кг)	22/31 (70,97 %)	34,5 (27,3 – 41,3)	39,6 (30,2 – 45,9) (n = 10)
<b>Реамберин</b>			
Контроль	19/34 (55,88 %)	29,0 (23,0 – 38,0)	42,6 (35,4 – 47,9) (n = 10)
1/2 ЭСТД (25 мл/кг)	18/31 (58,06 %)	50,5* (35,8 – 54,5)	51,4 (45,6 – 53,2) (n = 10)
ЭСТД (50 мл/кг)	13/31 (41,94 %)	38,0* (33,0 – 47,0)	45,3 (39,9 – 49,1) (n = 10)
2 ЭСТД (100 мл/кг)	11/31 (35,48 %)	49,0* (45,0 – 56,0)	46,8 (44,6 – 52,7) (n = 10)
<b>Мексидол</b>			
Контроль	30/51 (58,82 %)	7,5 (3,8 – 25,0)	38,0 (31,6 – 53,0) (n = 10)
1/2 ЭСТД (25 мг/кг)	17/26 (65,38 %)	46,0* (8,0 – 55,0)	52,2* (44,0 – 56,3) (n = 10)
ЭСТД (50 мг/кг)	21/32 (65,63 %)	9,0 (3,5 – 40,0)	40,2 (30,9 – 48,6) (n = 10)
2 ЭСТД (100 мг/кг)	19/26 (73,08 %)	15,0 (5,0 – 53,0)	43,5 (32,1 – 48,6) (n = 10)
<b>α-Липовая кислота</b>			
Контроль	30/51 (58,82 %)	7,5 (3,8 – 25,0)	42,6 (35,4 – 47,9) (n = 10)
1/2 ЭСТД (50 мг/кг)	18/26 (69,23 %)	31,0 (4,8 – 50,3)	47,9 (35,5 – 53,8) (n = 10)
ЭСТД (100 мг/кг)	19/32 (59,38 %)	6,0 (3,0 – 46,0)	30,3* (22,8 – 36,1) (n = 10)
2 ЭСТД (200 мг/кг)	14/26 (53,85 %)	35,5* (5,8 – 51,5)	36,9 (32,2 – 49,8) (n = 10)

#### Примечание:

абсолютные показатели летальности представлены дробью, в числителе которой – количество мышей, погибших в течение 60 мин после подкожного введения 14 мг/кг адреналина гидрохлорида, в знаменателе – общее количество животных в группе. Показатели летальности не отличались от контроля ( $p > 0,05$ , по точному критерию Фишера во всех случаях);

длительность жизни погибших мышей (в пределах 1 ч после введения адреналина) и выраженность формалинового отека представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — [Me (LQ-UQ)];

размер выборок по показателям длительности жизни погибших мышей при острой адреналиновой интоксикации соответствует числителю в колонке летальность; размер выборок в эксперименте с формалиновым отеком обозначен символом “n” в соответствующей колонке;

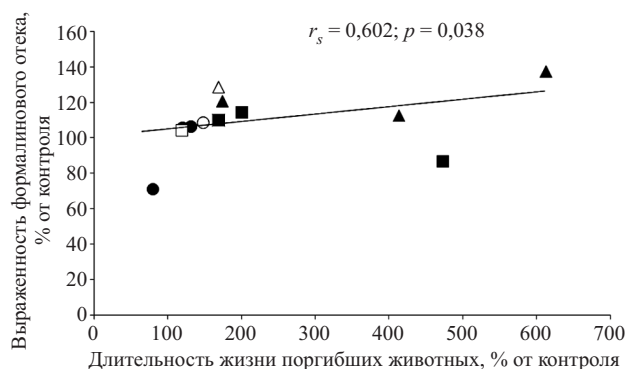
\* отличия от контроля достоверны ( $p < 0,05$  по критерию Манна-Уитни).

Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS-17.0. Данные по латентности гибели мышей при адреналиновой интоксикации и формалиновому отеку обработаны методами дескриптивной статистики и представлены в виде медианы (Me) и диапазона между “нижним” (LQ, 25 процентиль) и “верхним” (UQ, 75 процентиль) квартилями. О достоверности межгрупповых различий судили по U-критерию Манна-Уитни. Статистическую значимость различий по показателям летальности после введения адреналина оценивали с помощью точного критерия Фишера. Оценку взаимосвязи между стандартизованными по контролю результатами I-й и II-й экспериментальных серий проводили, рассчитывая коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Проверка статистических гипотез выполнялась при критическом уровне значимости  $p = 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Результаты I-й серии экспериментов продемонстрировали, что изученные ЛС не оказывали влияния на показатели летальности мышей при острой адреналиновой интоксикации, но существенно пролонгировали жизнь животных, погибавших в пределах 1 ч после введения адреналина (таблица). Наиболее ярко данный эффект проявился на фоне введения реамберина, который оказался единственным препаратом, способным достоверно увеличивать латентность гибели животных во всем диапазоне изученных доз. Выраженность протекторного действия данного производного янтарной кислоты при острой адреналиновой интоксикации подчинялась U-образной зависимости от дозы с наибольшей выраженностью эффекта в минимальной (1/2 ЭСТД) и максимальной (2 ЭСТД) дозировках. Защитное действие реамберина может быть связано с реализацией НАД-независимой субстратной функции янтарной кислоты, играющей центральную роль в обеспечении аэробного энергетического обмена при ишемии, закономерно развивающейся на фоне адреналиновой интоксикации [12]. Вполне вероятно, что данный механизм протекторного действия реамберина реализуется на уровне сердца, являющегося первоочередной мишенью повреждающего эффекта токсических доз адреналина [13]. Правомерность данного предположения иллюстрируется положительным инотропным действием реамберина у больных сахарным диабетом [1], который характеризуется существенной активацией симпатoadреналовой системы [14].

Протекторная активность производных 3-оксипиридина (эмоксипина и мексидола) по характеру дозовой зависимости существенно отличалась от реамберина (таблица). Защитное действие эмоксипина прогрессивно уменьшалось по мере нарастания дозы и достигало уровня статистической значимости лишь при использовании относительно низких дозировок (1/2 ЭСТД и ЭСТД). Аналогичная закономерность наблюдалась при введении мексидола, который оказывал



Зависимость протекторного действия изученных препаратов при острой адреналиновой интоксикации от их влияния на формалиновый отек: треугольником обозначены 1/2 ЭСТД, кругом — ЭСТД, квадратом — 2 ЭСТД; прозрачная заливка — эмоксипин; черная заливка — реамберин; серая заливка с очерченными контурами — мексидол; серая заливка без очерченных контуров —  $\alpha$ -липовая кислота.

значимый защитный эффект только в минимальной дозе. Снижение протекторной активности эмоксипина и мексидола при увеличении их дозировок (таблица) хорошо соответствует ранее опубликованному факту уменьшения их антиоксидантной активности *in vitro* по мере нарастания концентрации этих производных 3-оксипиридина [15]. Не исключено, что известный феномен “концентрационной инверсии антиоксидантного эффекта” [16] имеет прямое отношение к уменьшению защитного действия эмоксипина и мексидола при их использовании в относительно высоких дозах. При этом следует подчеркнуть, что фатальные кардиотоксические эффекты адреналина во многом связаны с его прооксидантным действием [13]. Следует обратить внимание на то, что мексидол, одновременно являющийся производным 3-оксипиридина и янтарной кислоты, уступал изолированному производному 3-оксипиридина (эмоксипину) по дозовой распространенности протекторного действия (таблица). Это может быть связано с непрямым прооксидантным действием сукцинатного аниона в структуре мексидола, поскольку конечным продуктом митохондриального окисления янтарной кислоты является  $H_2O_2$ , играющая общеизвестную роль в индукции свободно-радикального окисления [16]. Стоит добавить, что наличие янтарной кислоты в составе мексидола существенно снижает как антиоксидантный потенциал данного ЛС, так и положительную инотропную активность его 3-оксипиридинового компонента при сахарном диабете [1, 15]. Нельзя исключить также, что опосредованное прооксидантное действие янтарной кислоты в составе реамберина в определенной степени ограничивает его протекторное действие при адреналиновой интоксикации и является причиной нелинейной зависимости данного эффекта от дозы.

Препарат сравнения ( $\alpha$ -ЛК), в отличие от эмоксипина, реамберина и мексидола, пролонгировал жизнь мышей, погибавших после введения адреналина, только при использовании максимальной дозы (таблица). По-видимому, это обусловлено наиболее выраженной

антигипоксической активностью  $\alpha$ -ЛК при введении в данной дозировке [8]. Нельзя исключить, что антигипоксическая активность эмоксипина и мексидола, наиболее выраженная в низких дозах [8], тоже вносит определенный вклад в протекторное действие этих производных 3-оксипиридина при острой адреналиновой интоксикации. Данное предположение не распространяется на реамберин, который не влияет на устойчивость к острой гипоксической гипоксии [8].

Результаты II-й серии экспериментов позволили выявить значимое противовоспалительное действие только у препарата сравнения ( $\alpha$ -ЛК), уменьшавшего формалиновый отек при использовании средней дозировки (ЭСТД) (таблица). Реамберин не влиял на устойчивость к флоготенному действию формалина, а производные 3-оксипиридина (эмоксипин и мексидол) достоверно увеличивали выраженность формалинового отека при использовании в минимальных дозах. Установленный феномен может быть следствием антиагрегантного действия производных 3-оксипиридина [17], благодаря которому эмоксипин и мексидол препятствуют тромбированию микроциркуляторного русла и за счет этого усиливают гиперемии и сопутствующий отёк в зоне формалинового воспаления. Не исключено также, что производные 3-оксипиридина усиливают эдемогенное действие формалина за счет потенцирования ГАМК-ергических механизмов вазодилатации в зоне тканевого повреждения. Такая возможность иллюстрируется нарастанием постшемической церебральной гиперемии на фоне предишемического введения мексидола, вазодилатирующее действие которого блокируется бикакулином [18]. Следует особо подчеркнуть очевидное сходство дозовых зависимостей протекторного действия производных 3-оксипиридина при адреналиновой интоксикации и их потенцирующего влияния на формалиновый отёк (таблица). Стандартизация полученных данных по медианам контрольных групп и последующий корреляционный анализ позволили установить универсальный характер отмеченной закономерности для всей совокупности изученных ЛС. Как видно (рисунок), защитный эффект всех использованных препаратов при адреналиновой интоксикации нарастает в прямой зависимости от их способности усиливать формалиновый отёк.

По-видимому, протекторное действие исследованных препаратов при острой адреналиновой интоксикации, также как их потенцирующее влияние на формалиновое воспаление, в значительной степени зависят от выраженности вазодилатирующего эффекта в зонах тканевого повреждения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Волчегорский, М. Г. Москвичева, Е. Н. Чащина, *Тер. архив*, **77**(10), 10 – 15 (2005).
2. И. А. Волчегорский, П. Н. Новоселов, Т. В. Астахова, *Тер. архив*, **81**(11), 21 – 24 (2009).
3. И. А. Волчегорский, К. М. Местер, *Журн. неврол. и псих. им. С. С. Корсакова*, **3**, 19 – 24 (2010).
4. И. А. Волчегорский, Е. В. Тур, О. В. Соляникова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(7), 20 – 26 (2012).
5. О. В. Кашичкина, Н. А. Кригер, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, приложение **1**, 167 – 171 (2006).
6. Л. Н. Семченко, Т. В. Дроздова, М. Н. Зиновьева, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, приложение **1**, 75 – 77 (2006).
7. И. А. Волчегорский, И. И. Долгушин, О. Л. Колесников, В. Э. Цейликман, *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*, Издательство Челябинского государственного педагогического университета, Челябинск (2000).
8. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, И. Ю. Мирошниченко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(12), 27 – 32 (2011).
9. Р. А. Копаладзе, *Успехи физиол. наук*, **29**(4), 74 – 92 (1998).
10. В. В. Гацура, *Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ*, Медицина, Москва (1974).
11. Л. А. Балтина, В. А. Давыдова, И. Г. Чикаева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **22**(6), 694 – 697 (1988); *Chem. Pharm. J.*, **22**(6), 460 – 462 (1988).
12. М. В. Биленко, *Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения)*, Медицина, Москва (1989).
13. И. Ю. Искусных, Т. Н. Попова, О. С. Мушарова, *Биомед. химия*, **58**(5), 530 – 538 (2012).
14. О. А. Кисляк, Т. О. Мышляева, Н. В. Малышева, *Сахарный диабет*, **1**, 45 – 49 (2008).
15. И. А. Волчегорский, Л. М. Рассохина, И. Ю. Мирошниченко, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **9**, 295 – 301 (2010).
16. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты*, Фирма "Слово", Москва (2006).
17. И. В. Окуневич, Н. С. Сапронов, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **3**(3), 2 – 17 (2004).
18. А. В. Гнездилова, Т. С. Ганьшина, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **73**(10), 11 – 13 (2010).

Поступила 16.04.14

## THE EFFECT OF 3-OXYPYRIDINE AND SUCCINIC ACID DERIVATIVES ON THE RESISTANCE TO ACUTE ADRENALINE INTOXICATION AND FORMALIN EDEMA IN MICE

I. A. Volchegorskii, I. Yu. Miroshnichenko, and L. M. Rassokhina

Pharmacology Department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

A comparative study of the effect of domestic derivatives of 3-oxypyridine and succinic acid (emoxipine, reamberin, and mexidol) on acute adrenaline intoxication and formalin edema in mice was performed. In addition, the corresponding effects of  $\alpha$ -lipoic acid, which was previously used as a reference substance in evaluation of the antihypoxic activity of 3-oxypyridine and succinic acid derivatives, were studied. It was established that a single administration of emoxipine, reamberin, mexidol or  $\alpha$ -lipoic acid in the optimal dose, which corresponds to therapeutic range in humans, increases survival time in animals that otherwise died from acute adrenaline intoxication. Alpha-lipoic acid reduced formalin edema, while emoxipine and mexidol intensified the edema. The protective effect of all drugs against adrenaline intoxication increases in proportion to their ability to enhance formalin edema.

**Keywords:** 3-oxypyridine and succinic acid derivatives; adrenaline intoxication; formalin edema