

## АНТИАМНЕСТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЦИТОФЛАВИНА И НЕЙРОНОЛА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У КРЫС

В. В. Бульон, Ю. О. Федотова, А. Л. Коваленко, Л. Е. Алексеева, Н. С. Сапронов<sup>1</sup>

В экспериментах на крысах с ишемией головного мозга изучали антиамнестическое действие новых комплексных препаратов — цитофлавина и нейронола — на модели пассивного избегания. Морфологическими методами исследования оценивали нейропротективный эффект препаратов. Установлено, что цитофлавин и нейронол защищают нейроны пирамидного слоя аммонова рога гиппокампа от повреждения и препятствуют развитию амнезии во все изученные сроки ишемии мозга (3 – 21-е сутки). Оба препарата улучшают горизонтальную двигательную активность и эмоциональные реакции крыс в тесте “открытое поле”.

**Ключевые слова:** ишемия мозга, амнезия, гиппокамп, цитофлавин, нейронол

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из проявлений ишемического нарушения мозгового кровообращения является нарушение памяти. Для ее восстановления используют ноотропные препараты [3, 11, 14, 17], однако вещества, применяемые в настоящее время для лечения когнитивного дефицита, имеют ряд ограничений и недостатков. Поэтому поиск новых фармакологических средств, восстанавливающих нарушенные мнестические функции, представляется актуальным.

Известно, что препараты метаболического типа действия оказывают антиамнестический эффект [3]. В НТФФ “Полисан” создан комплексный препарат цитофлавин, в состав которого входят янтарная кислота (300 мг), рибоксин (50 мг), никотинамид (25 мг) и рибофлавин-мононуклеотид (5 мг). Янтарная кислота и рибоксин улучшают энергетические процессы в нейронах, активируют синтез РНК и белков [4, 5]. Янтарная кислота является также активным антиоксидантом направленного митохондриального действия [4]. Никотинамид способствует усилению биосинтеза НАД-коферментов и стимулирует образование АТФ [5]. Рибофлавин проявляет антигипоксические свойства на разных моделях [5].

Ранее показано, что цитофлавин, оказывает нейропротективное действие при постишемическом реперфузионном повреждении головного мозга [1].

В настоящее время в НТФФ “Полисан” создана новая фармацевтическая композиция нейронол. Его компонентами являются янтарная кислота (100 мг), рибоксин (70 мг), никотинамид (20 мг), рибофлавин-мононуклеотид (7 мг), пирацетам (70 мг) и пиридоксин-НСI (7 мг). Как известно, пирацетам влияет на внутриклеточные процессы: активирует анаэробное и

аэробное окисление глюкозы, усиливает синтез РНК и протеинов, активирует аденилатциклазу, подавляет перекисное окисление липидов в митохондриях [3]. Пиридоксин-НСI, превращаясь в организме в пиридоксаль-5-фосфат, входит в состав ферментов, осуществляющих декарбоксилирование и переаминирование аминокислот [6].

Цель данной работы — сравнительное изучение антиамнестического эффекта цитофлавина и нейронола в условиях ишемического нарушения церебрального кровообращения.

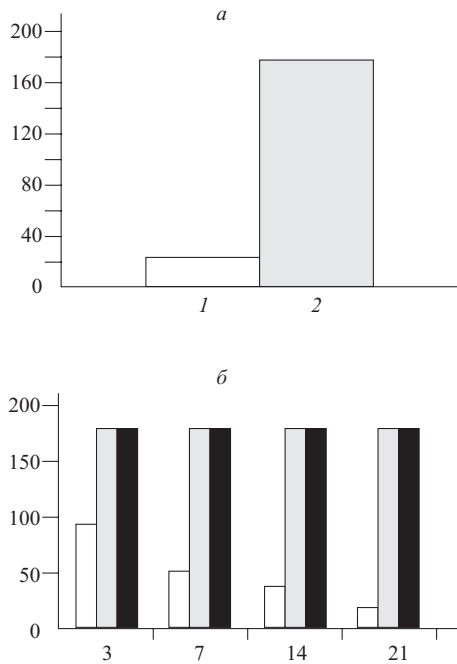
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 150 беспородных белых крысах-самцах массой 180 – 200 г. У всех интактных крыс до проведения эксперимента оценивали поведение в тесте “открытое поле” [9], вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) и регистрировали его воспроизведение через 24 ч после обучения [2]. Определяли латентный период (ЛП) перехода животных из светлого отсека камеры в темный.

Ишемию головного мозга у обученных животных вызывали посредством перевязки левой общей сонной артерии и ограничения кровотока по правой общей сонной артерии до 50% от исходного уровня [10].

Экспериментальных животных делили на следующие группы: ложнооперированные; контрольные (ишемия); крысы с ишемией мозга, получавшие цитофлавин или нейронол. У животных перечисленных групп оценивали поведение и воспроизведение навыка УРПИ в динамике — через 3, 7, 14 и 21-е сутки ишемии. Нейтрализованные растворы цитофлавина (175 мг/кг) и нейронола (125 мг/кг), а также физиологический раствор вводили животным внутривентриально через 30 мин после окклюзии и на следующий день однократно (вследствие тяжелого послеоперационного состояния). В последующем (3 – 21-е дни) исследуемые препараты, разведенные в растворе крахмала, крысы получали внутрь ежедневно однократно.

<sup>1</sup> Отдел нейрофармакологии (руководитель — член-корр. РАМН Н. С. Сапронов) НИИ экспериментальной медицины. Научно-технологическая фармацевтическая фирма “Полисан”, Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12



**Рис. 1.** Влияние цитофлавина и нейронола на воспроизведение навыка УРПИ у крыс с ишемией головного мозга.

*а* — формирование и воспроизведение УРПИ у ложнооперированных крыс: 1 — при обучении УРПИ, 2 — при тестировании УРПИ через 24 ч.

*б* — динамика воспроизведения УРПИ у крыс с ишемией мозга, получавших цитофлавин и нейронол. Столбики — ЛП захождения животного в темную камеру: светлые — контроль, серые — цитофлавин, темные — нейронол. По оси абсцисс — время, сут.

Для морфологического исследования готовили сагиттальные срезы левого и правого больших полуша-

рий мозга, которые окрашивали по методу Ниссля для оценки состояния нейронов пирамидного слоя гиппокампа (представлены фотографии гиппокампа наиболее пострадавшего левого полушария мозга).

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с применением *t*-критерия Стьюдента с помощью пакета прикладных программ Statgraphics.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных с нарушенным мозговым кровообращением наблюдали изменения всех компонентов поведения по сравнению с таковыми у ложнооперированных (таблица). Так, горизонтальная двигательная активность к 3-м суткам ишемии снижалась на 35 %, а к 21-м суткам — на 88 %; вертикальная двигательная активность уменьшалась к 3-м суткам ишемии на 95 % и оставалась такой же к 21-м суткам. У этих крыс отмечался дефицит эмоциональности: представленность груминга и дефекация снижались на 3-й день ишемии на 44 и 58 %, а на 21-й день — на 78 и 71 % соответственно. Изменение исследовательской активности наблюдали в течение 3–7 дней — количество обследованных норок животными увеличивалось на 97 и 143 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у крыс с ишемией мозга к 21-м суткам наблюдения отмечаются резко выраженные нарушения общей двигательной активности и эмоционального поведения.

У животных с ишемией мозга отмечалась амнезия навыка УРПИ во все сроки наблюдения (рис. 1). Так, на 3-й день ишемии ЛП перехода крыс в темную каме-

### Влияние цитофлавина и нейронола на поведение крыс с ишемией мозга в тесте “открытое поле” в течение 180 с ( $M \pm m$ )

Группа животных	Двигательная активность		Исследовательская активность	Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Груминг	Дефекация
Ложнооперированные	62,7 ± 6,9	13,2 ± 3,2	3,0 ± 0,5	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,2
3-и сутки ишемии:					
плацебо	40,9 ± 2,3 <sup>#</sup>	0,6 ± 0,03 <sup>#</sup>	5,9 ± 0,4	1,8 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,0 ± 0,4 <sup>#</sup>
цитофлавин	19,9 ± 2,1*	3,0 ± 0,8*	7,7 ± 0,7*	3,6 ± 0,7*	1,6 ± 0,6
нейронол	16,0 ± 1,5*	1,4 ± 0,7*	1,7 ± 0,4*	1,7 ± 0,7	0,9 ± 0,4
7-е сутки ишемии:					
плацебо	45,4 ± 1,4 <sup>#</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>#</sup>	7,3 ± 0,7 <sup>#</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>#</sup>	3,7 ± 0,4
цитофлавин	29,4 ± 2,8*	3,3 ± 0,6*	4,7 ± 2,7*	1,8 ± 0,6	1,0 ± 0,4*
нейронол	19,1 ± 1,9*	3,1 ± 0,9*	3,5 ± 0,7*	1,6 ± 0,6	1,3 ± 0,5*
14-е сутки ишемии:					
плацебо	22,3 ± 4,5 <sup>#</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>#</sup>	4,4 ± 0,8 <sup>#</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>#</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>#</sup>
цитофлавин	32,7 ± 1,6	4,9 ± 0,4*	2,9 ± 2,7	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,4
нейронол	24,8 ± 2,6	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3*	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,3*
21-е сутки ишемии:					
плацебо	7,4 ± 1,1 <sup>#</sup>	0,9 ± 0,5 <sup>#</sup>	2,1 ± 0,4	0,7 ± 0,3 <sup>#</sup>	0,7 ± 0,3 <sup>#</sup>
цитофлавин	30,1 ± 0,6*	1,3 ± 0,3	3,4 ± 0,6	1,6 ± 0,3*	1,8 ± 0,4*
нейронол	47,5 ± 1,8*	1,8 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,6 ± 0,3*	1,6 ± 0,3*

**Примечание.** Различия статистически значимы при  $p < 0,05$  по отношению: <sup>#</sup> — к интактной группе; \* — к соответствующей группе с плацебо. В группах по 8–10 животных.

ру снижался на 48 % ( $94,4 \pm 1,9$  с,  $p < 0,05$ ) по сравнению с этим показателем у ложнооперированных животных (180 с). В дальнейшем, на 7 – 14-й день происходило угасание УРПИ, что выражалось в падении ЛП на 71 % ( $52,1 \pm 3,2$  с,  $p < 0,05$ ) и 79 % ( $38,7 \pm 2,5$  с,  $p < 0,05$ ) соответственно. К 21-м суткам ишемии ЛП контрольных крыс составлял уже  $21,4 \pm 2,2$  с и практически соответствовал ЛП ложнооперированных животных до обучения ( $28,7 \pm 4,7$  с). Представленные данные говорят о нарушении процессов сохранения энграммы долговременной памяти и закрепления полученной информации в условиях нарушения церебрального кровообращения.

Сравнительный анализ результатов, полученных при изучении поведенческих реакций в тесте “открытое поле” и воспроизведения навыка УРПИ, указывает на отсутствие четкой корреляции между структурой целенаправленного поведения и ухудшением воспроизведения навыка УРПИ. Этот факт свидетельствует о неоднозначном влиянии ишемии головного мозга на поведение и память.

Известно, что недостаточность мнестических функций, возникающая при нарушении мозгового кровообращения, протекает на фоне выраженных структурных изменений ткани мозга. Так, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* обнаружены деструкция и гибель нейронов пирамидного слоя аммонова рога гиппокампа преимущественно в поле СА1 [8, 12, 13, 15, 16].

Морфологическое исследование, проведенное на использованной нами модели нарушения мозгового кровообращения, показало, что в ранние сроки ишемии (3 – 7-й дни) отмечалось острое диффузное ишемическое повреждение нейронов пирамидного слоя гиппокампа (рис. 2, а). На 21-й день наблюдения на фоне ишемически поврежденных нейронов определялись атрофированные нервные клетки (рис. 2, б).

Цитофлавин и нейронол оказывали фазное и неоднозначное действие на все компоненты поведения животных с нарушенным мозговым кровообращением (таблица). Однако к 21-м суткам ишемии препараты значительно улучшали горизонтальную двигательную активность и эмоциональный компонент поведения крыс. Причем положительный эффект нейронола на горизонтальную двигательную активность был более выражен, чем у цитофлавина.

Цитофлавин и нейронол препятствовали развитию амнезии УРПИ во все сроки ишемии — ЛП захождения крыс этих групп в темную камеру, как и у ложнооперированных крыс, составлял 180 с (рис. 1). Эти данные указывают на способность препаратов прочно и стабильно сохранять выработанный условный рефлекс и извлекать след памяти в условиях нарушенного мозгового кровообращения.

Сравнительный анализ результатов тестирования поведенческих реакций и воспроизведения навыка УРПИ у крыс с нарушенным церебральным кровооб-

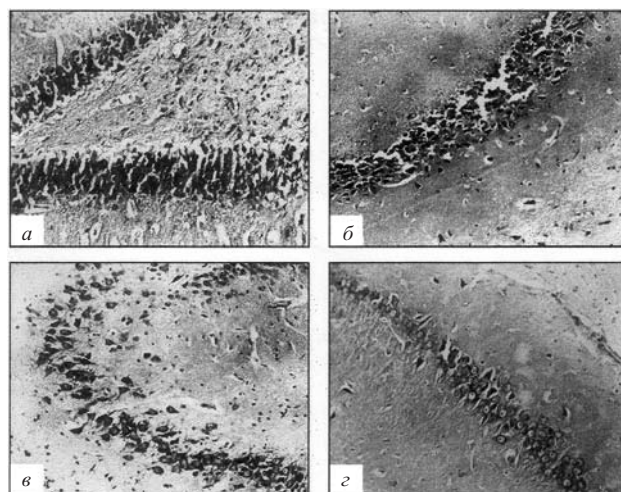


Рис. 2. Влияние цитофлавина и нейронола на деструктивные изменения в нейронах пирамидного слоя аммонова рога гиппокампа.

а — 3-и сутки ишемии. Острое диффузное ишемическое повреждение нейронов.  $\times 200$ ; б — 21-е сутки ишемии. Атрофия нервных клеток на фоне диффузного ишемического повреждения нейронов.  $\times 200$ ; в — 14-е сутки ишемии, нейронол. Единичные нейроны с деструктивными изменениями.  $\times 200$ ; з — 14-е сутки ишемии, цитофлавин. Единичные нейроны с деструктивными изменениями.  $\times 200$ .

ращением, получавших цитофлавин и нейронол, указывает на отсутствие корреляции между ними. Полученные факты свидетельствуют о дифференцированном влиянии препаратов на сохранение УРПИ и поведенческие реакции. В связи с этим можно заключить, что положительный эффект препаратов на воспроизведение навыка УРПИ не связан с их действием на поведенческие реакции.

Результаты морфологического исследования показали, что цитофлавин и нейронол оказывали защитное действие на пирамидные нейроны гиппокампа во все сроки ишемии. Так, на 3 – 7-й дни ишемии отмечались отдельные очаги поврежденных нервных клеток, а на 14 – 21-е сутки встречались лишь единичные поврежденные клетки (рис. 2, в, з).

Данные литературы о специфическом механизме ноотропного эффекта пирacetама противоречивы. Имеются сведения о том, что пирacetам облегчает преимущественно начальные фазы обработки информации, а фазу ее извлечения не улучшает или даже ухудшает [7]. На основании этого можно полагать, что в условиях нарушенного мозгового кровообращения антиамнестическое действие нейронола и цитофлавина обусловлено их защитным действием на метаболизм нервной ткани.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют, что цитофлавин и нейронол, являясь нейрометаболическими стимуляторами, обладают нейропротективными и ноотропными свойствами при ишемии головного мозга. Полученные данные позволяют считать цитофлавин и нейронол перспективными средствами для терапии нарушений мозгово-

го кровообращения ишемического характера, сопровождающихся дефицитом когнитивных функций.

## ВЫВОД

Цитофлавин и нейронол оказывают нейропротективное действие — защищают нейроны гиппокампа от ишемического повреждения, а также проявляют одинаковое антиамнестическое действие в условиях ишемического нарушения мозгового кровообращения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Бульон, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов и др., *Бюл. exper. биол.*, **2**, 149 – 151 (2000).
2. Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. Высшая школа, Москва (1991), сс. 135 – 240.
3. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(4), 3 – 9 (1998).
4. Ю. Ю. Ивницкий, А. И. Головкин, Г. А. Софронов, *Янтарная кислота в системе метаболической коррекции функционального состояния и резистентности организма*, С.-Петербург (1998).
5. В. Д. Лукьянчук, А. В. Савченкова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **61**(4), 72 – 79 (1998).
6. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, т. 2, Харьков (1993), сс. 80 – 81.
7. Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
8. В. А. Отеллин, Д. Э. Коржевский, В. Б. Косткин и др., *Докл. АН*, **390**(3), 406 – 408 (2003).
9. Е. С. Петров, Н. С. Лазаренко, С. В. Кунцевич, *Ж. высш. нервн. деят.*, **32**(2), 347 – 351 (1982).
10. М. Б. Плотников, О. Е. Визова, *Пат. физиол.*, № 2, 59 – 60 (1994).
11. Г. А. Романова, Ф. М. Шакова, Т. А. Гудашева, Р. У. Островская, *Психофармакол. и биол. Наркол.*, № 3, 4, 442 (2002).
12. Л. Г. Хаспеков, М. В. Онуфриев, А. А. Лыжин и др., *Нейрохимия*, **20**(1), 60 – 64 (2003).
13. M. Balestrino, R. Rebaudo, and G. Lunardi, *Brain Res.*, **816**(1), 124 – 130 (1999).
14. C. V. Borlongan, D. W. Cahill, and P. R. Sanberg, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **52**(4), 695 – 699 (1995).
15. J. H. Laake, F. M. Haug, T. Wieloch, and O. P. Ottersen, *Brain Res. Protoc.*, **4**, 173 – 184 (1999).
16. A. K. Pringle, F. Iannotti, G. J. C. Wilde, et al., *Brain Res.*, **755**, 36 – 46 (1997).
17. A. E. Willing, L. Jiang, P. Nowicki, et al., *J. Neurol. Sci.*, **15**, 203 – 204 (2002).

Поступила 15.09.03

## ANTIAMNESIC EFFECT OF CYTOFLAVIN AND NEURONOL IN RATS WITH ISCHEMIC IMPAIRMENT OF CEREBRAL CIRCULATION

V. V. Bul'on, Yu. O. Fedotova, A. L. Kovalenko, L. E. Alekseeva, and N. S. Sapronov

Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia  
 "Polysan" Pharmaceutical Research and Technology Company, St. Petersburg, Russia

The anti-amnesic action of the new complex preparations cytoflavin and neuronol was studied in rats with a cerebral ischemia model, tested for the passive avoidance conditioned reflex. The neuroprotector effect of drugs was determined by morphological methods. Both cytoflavin and neuronol reduced neuronal damage in the pyramidal layer of the hippocampus and prevented the development of amnesia during the entire period of cerebral ischemia (3 – 21 days). Both drugs also improved horizontal locomotor activity and emotional reactions of animals in the open field test.