

И. Г. Агамалян\*, С. Т. Карамян, М. Г. Баласанян

## СИНТЕЗ И ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНАЯ АКТИВНОСТЬ НИКОТИНОИЛ-Л-ПРОЛИНА

Ереванский государственный медицинский университет имени М. Гераци (ЕГМУ), Армения, 0025, Ереван, ул. Корюна, 2.

\* e-mail: iskuhi.hamletovna@mail.ru

Выявлена цереброваскулярная активность нового синтезированного соединения никотиноил-Л-пролина в условиях острой церебральной ишемии, вызванной окклюзией левой сонной артерии у крыс, и хронической ишемии мозга, вызванной ограничением двигательной активности животных — гипокинезией. Методом лазерной доплеровской флоуметрии установлено, что внутривентрикулярное введение исследуемого соединения в дозе 10 мг/кг стимулирует локальный мозговой кровоток, восстанавливая кровоснабжение мозга крыс более чем на 40 %, как в условиях острой ишемии мозга, так и на фоне хронической ишемизации мозговой ткани, вызванной ограничением двигательной активности животных в течение 15 дней. Регистрация системного артериального давления крыс неинвазивным методом “Tail-cuff” показала, что цереброваскулярные эффекты никотиноил-Л-пролина не сопровождаются изменениями показателей системного артериального давления и частоты сердечных сокращений у животных.

**Ключевые слова:** никотиноил-Л-пролин; мозговой кровоток; церебральная ишемия; гипокинезия.

Несмотря на широкий спектр лекарств, используемых для лечения цереброваскулярных расстройств, ишемические нарушения мозга продолжают оставаться второй причиной смерти в развитых странах и основной причиной инвалидности населения земного шара [1]. Более того, тенденция роста сердечно-сосудистых заболеваний наблюдается из года в год [2, 3]. В связи с этим создание и разработка препаратов, обладающих цереброваскулярной активностью, остается одной из важных задач современной медицины.

Среди множества лекарств, используемых для коррекции нарушений мозгового кровообращения и метаболических сдвигов после ишемических изменений, особого внимания заслуживают препараты эндогенного происхождения. Примером подобных средств с доказанной эффективностью при лечении сердечно-сосудистых заболеваний и устранении их психоневрологических последствий могут служить Пикамилон и Ноопепт [4, 5].

Ноопепт — соединение, содержащее в своей структуре дипептид L-пролилглицин. Экспериментальные исследования и клинические испытания показали цереброваскулярную, нейропротекторную, мнемотропную и анксиолитическую активность ноопепта [5]. Пикамилон — производное никотиновой и гамма-аминомасляной кислот. Помимо упомянутых свойств, пикамилон обладает также и способностью предотвращать повреждение эндотелия [6].

На основании приведенных выше данных нами был синтезирован никотиноил-Л-пролин (NLP) и исследована цереброваскулярная активность нового соединения [7]. Влияние указанного соединения на мозговой кровоток исследовано на двух экспериментальных моделях церебральной ишемии: острой ишемии, вызванной окклюзией левой сонной артерии (ОЛСА) крыс, и

хронической ишемизации мозговой ткани в условиях ограничения двигательной активности животных — гипокинезии (ГК). В качестве модели хронической ишемии мозга была использована модель гипокинезии, поскольку среди факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний особенно актуальным стал малоподвижный образ жизни, который в настоящее время имеет экспоненциальный рост [8]. Более того, экспериментальные исследования свидетельствуют, что в условиях ГК регистрируются патоморфологические, биохимические и функциональные изменения, характерные для хронической ишемии головного мозга [9].

### *Экспериментальная химическая часть*

#### **Синтез никотиноил-Л-пролина**

В химический стакан емкостью 0,25 л, предварительно стабилизированный по температуре и охлажденный охлаждающей смесью, помещают 10 мл концентрированной соляной кислоты, добавляют 5 мл дистиллированной воды, затем 6,8 г (0,05 моль) гидразида никотиновой кислоты. При поддержании температуры в пределах  $-8 \div -5$  °С и быстром перемешивании в течение 10 мин добавляют 6,8 г (0,1 моль) нитрита натрия, растворенного в 10 мл дистиллированной воды. pH реакционной среды составляет 6,5–7,5. Аморфный осадок образовавшегося азидид быстро фильтруют в условиях вытяжного шкафа, промывают 10 мл холодной воды и переносят в круглодонную колбу емкостью 0,25 л с двумя горловинами, к которой приспособлены мешалка и термометр. В эту колбу помещают 5,7 г (0,05 моль) L-пролина, растворенного в 100 мл 1 н. гидроксида натрия. Азидид добавляют в условиях охлаждения до  $-50$  °С. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Воду удаляют из смеси с помощью роторного ис-

парителя. Полученный аморфный осадок растворяют в 15 мл дистиллированной воды и в условиях охлаждения подкисляют 1 н. соляной кислотой до pH 4,5 – 5. Образовавшийся осадок фильтруют, промывают эфиром. После повторного осаждения в смеси спирт — эфир (1: 1) выход составляет 4,96 г (45,3 %), белое кристаллическое водорастворимое соединение, т. пл. 193 – 194 °С.  $R_f$  0,49 на тонком слое силикагеля Silufol UV-254 в системе пропанол — вода, 7:3, проявитель — пары йода. М.в. 219,21. Вычислено, %: С 64,83; Н 5,06; N 12,77.  $C_{11}H_{11}N_2O_3$ . Найдено, %: С 64,51; Н 4,90; N 12,53.  $^1H$  ЯМР-спектр (Mercury 300 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.): 1,83 – 2,12 (3H, m) и 2,22 – 2,38 (1H, m) ( $\beta$ ,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3,49 – 3,67 (2H, m,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 4,31 (0,2H, dd, J 8,0, 2,3 Гц) и 4,45 (0,8H, dd, J 8,3, 4,5 Гц) ( $\alpha$ -CH Pro), 7,35 – 7,40 (0,2H, m) и 7,41 (0,8H, dd, J 7,8, 4,8 Гц) (5-H Pyr), 7,76 (0,2H, уш. с, J 7,7 Гц) и 7,90 (0,8H, ddd, J 7,8, 2,3, 1,5 Гц) (4-H Pyr), 8,53 – 8,59 (0,4H, m, 2,6-H Pyr), 8,60 (0,8H, dd, J 4,8, 1,5 Гц, 6-H Pyr), 8,70 (0,8H, уш. с, J 1,5 Гц, 2-H Pyr), 10,93 (1H, уш. с, COOH). ИК-спектр ( $\lambda_{max}$ , см<sup>-1</sup>): 1610 (аром.), 1710 (карбонил), 1770 (амид), 3060, 3160, 3200 (CONH расшир.).

### Экспериментальная фармакологическая часть

Эксперименты проводились на беспородных белых крысах-самцах массой 170 – 230 г, содержащихся в стандартных условиях лабораторного вивария в соответствии с Руководством PHS [10] по уходу и использованию лабораторных животных и одобренных этическим комитетом ЕГМУ. Накануне экспериментов животных лишали пищи со свободным доступом к воде.

Локальный мозговой кровоток (ЛМК) оценивали с помощью лазерного доплер-флоуметра (Transonic Sistem Inc. BLF-21, США) [11] под общей анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б). Влияние NLP на мозговое кровообращение оценивали в различных дозах (5, 10 и 20 мг/кг).

Острую ишемию моделировали окклюзией левой сонной артерии (ОЛСА). После установки датчика лазерного расходомера на головном мозге крысы проводили мониторинг ЛМК путем регистрации его значений до ОЛСА, через 30 мин после окклюзии и после внутрибрюшинной инъекции NLP (каждые 10 мин в течение 90 мин). Изменения ЛМК оценивали и выражали в процентах, принимая исходное значение кровотока равным 100 %.

Хроническую ишемию головного мозга моделировали в условиях гипокинезии, вызванной ограничением двигательной активности по Федорову [12]. Животных на 15 дней помещали в специальные, ограничивающие их движения клетки из оргстекла: крысы имели возможность передвигаться лишь на шаг вперед и назад или вращаться вокруг своего хвоста. Через 15 дней гипокинезии регистрировали ЛМК до и после внутрибрюшинного введения NLP каждые 10 мин до 90 минуты эксперимента.

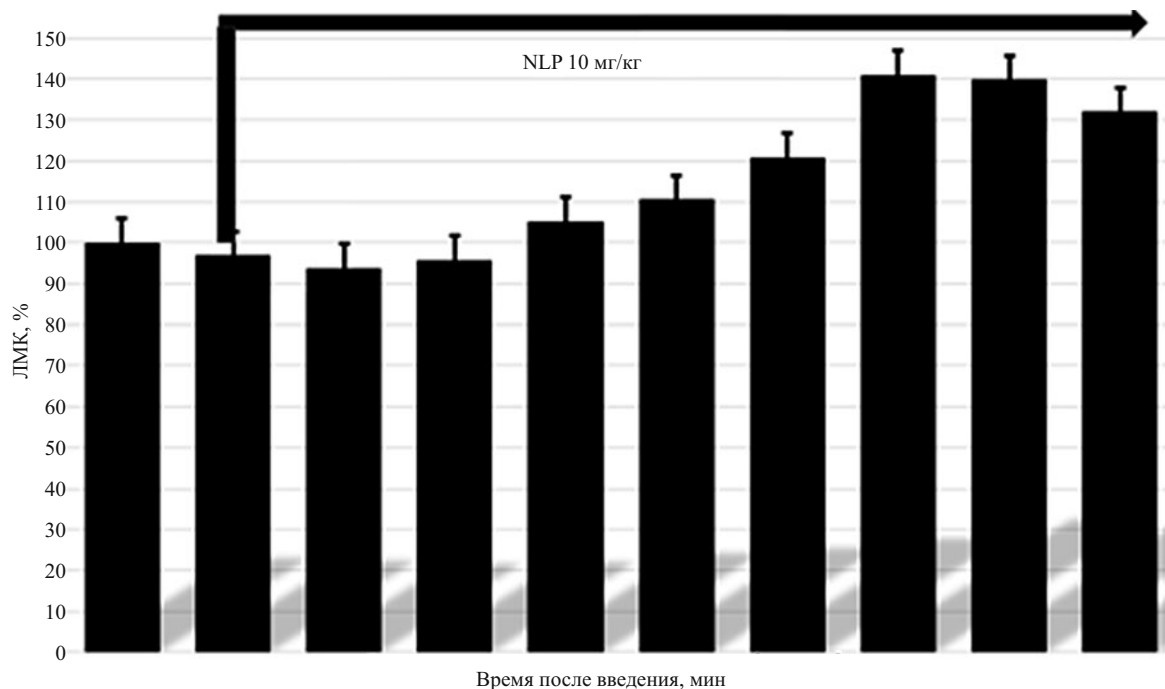
Мониторинг систолического артериального давления (САД), диастолического артериального давления (ДАД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) проводился с использованием манометра установки неинвазивного метода “Tail-cuff”, который позволяет оценивать САД, ДАД на хвостовой артерии крыс, а также ЧСС без наркоза [13]. В течение 3 – 5 дней до эксперимента крыс адаптировали к фиксатору, в который помещали животных для ограничения движений в течение всего периода измерения артериального давления. Каждые 10 мин измеряли САД, ДАД и ЧСС на протяжении 30 мин до введения препарата, затем мониторинг продолжали после внутрибрюшинного введения NLP с той же частотой на протяжении последующих 90 мин.

Результаты экспериментов представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Результаты экспериментов обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Достоверность отличия опытных дан-

Таблица 1  
Влияние различных доз никотиноил-L-пролина на локальный мозговой кровоток в условиях острой ишемии мозга ( $M \pm SD$ ,  $n = 18$ )

Группа	ЛМК, %					
Контроль	100					
ОЛСА	$65,5 \pm 13,8$ ( $p < 0,05$ )					
Время после в/б введения NLP						
10 мин	В дозе 5 мг/кг	$62,6 \pm 14,5$ ( $p^* > 0,05$ )	В дозе 10 мг/кг	$74,6 \pm 10,2$ ( $p^* > 0,05$ )	В дозе 20 мг/кг	$64,7 \pm 23,1$ ( $p^* > 0,05$ )
20 мин		$63,9 \pm 11,4$ ( $p^* > 0,05$ )		$75,8 \pm 21,3$ ( $p^* > 0,05$ )		$57,9 \pm 18,2$ ( $p^* > 0,05$ )
30 мин		$68,6 \pm 9,0$ ( $p^* > 0,05$ )		$76,88 \pm 17,4$ ( $p^* > 0,05$ )		$52,9 \pm 19,4$ ( $p^* > 0,05$ )
40 мин		$67 \pm 13,0$ ( $p^* > 0,05$ )		$82,2 \pm 12,9$ ( $p^* > 0,05$ )		$54,1 \pm 19,0$ ( $p^* > 0,05$ )
50 мин		$67,2 \pm 4,1$ ( $p^* > 0,05$ )		$89,4 \pm 15,6$ ( $p^* < 0,05$ )		$56,5 \pm 17,8$ ( $p^* > 0,05$ )
60 мин		$64,4 \pm 9,1$ ( $p^* > 0,05$ )		$95,1 \pm 14,1$ ( $p^* < 0,05$ )		$57,3 \pm 21,0$ ( $p^* > 0,05$ )
70 мин		$61,9 \pm 10,4$ ( $p^* > 0,05$ )		$87,3 \pm 14,8$ ( $p^* < 0,05$ )		$57,5 \pm 18,9$ ( $p^* > 0,05$ )
80 мин		$62,3 \pm 12,4$ ( $p^* > 0,05$ )		$93,77 \pm 17,5$ ( $p^* < 0,05$ )		$56,6 \pm 20,1$ ( $p^* > 0,05$ )
90 мин		$62,0 \pm 13,1$ ( $p^* > 0,05$ )		$91,7 \pm 9,8$ ( $p^* < 0,05$ )		$60,3 \pm 20,9$ ( $p^* > 0,05$ )

Примечания: ЛМК — локальный мозговой кровоток; NLP — никотиноил-L-пролин; ОЛСА — окклюзия левой сонной артерии.  $p$  — по сравнению с контролем,  $p^*$  — по сравнению с ОЛСА.



	Исх. уровень	10 м	20 м	30 м	40 м	50 м	60 м	70 м	80 м	90 м
ЛМК (%)	100	96,7 ± 6,6 <i>p</i> > 0,05	93,8 ± 9,0 <i>p</i> > 0,05	95,7 ± 12,2 <i>p</i> > 0,05	105,1 ± 12 <i>p</i> > 0,05	110,5 ± 11, 5 <i>p</i> > 0,05	120,9 ± 10, 6 <i>p</i> < 0,05	141,0 ± 15, 8 <i>p</i> < 0,05	139,9 ± 27, 1 <i>p</i> < 0,05	132,1 ± 26, 1 <i>p</i> < 0,05

Влияние никотиноил-L-пролина в дозе 10 мг/кг на локальный мозговой кровоток после 15-дневной гипокинезии ( $M \pm SD$ ,  $n = 8$ ).  
Примечания: ЛМК — локальный мозговой кровоток; NLP — никотиноил-L-пролин. *p* — по сравнению с исходным уровнем.

ных от контрольных значений оценивалась по *t*-критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Проведенные эксперименты по изучению влияния различных доз NLP на локальный мозговой кровоток показали (табл. 1), что после ОЛСА в ипсилатеральном полушарии регистрируется снижение мозгового кровотока, значение которого составило  $65,5 \pm 13,8\%$  показателя исходного контрольного уровня до перевязки, условно принятого за 100 %. Статистический

анализ данных, полученных при регистрации кровотока коры головного мозга, показал, что в/б введение исследуемого соединения в дозе 5 мг/кг не приводит к изменению нарушенного окклюзией мозгового кровообращения.

Способность NLP стимулировать мозговое кровообращение была зарегистрирована при введении препарата в дозе 10 мг/кг. Так, начиная с 10 мин после инъекции NLP в указанной дозе, на фоне окклюзии отмечалось увеличение ЛМК, максимальное значение которого регистрировалось на 60 мин после введения дипептида. Мозговой кровоток продолжал держаться

Таблица 2  
Влияние никотиноил-L-пролина на системное артериальное давление и частоту сердечных сокращений в дозе 10 мг/кг ( $M \pm SD$ ,  $n = 8$ )

	САД	ДАД	ЧСС
Исх. уровень	127,8 ± 3,8	91,9 ± 1,7	406,6 ± 14,7
10 мин	127,6 ± 7,4 ( <i>p</i> > 0,05)	95,1 ± 4,4 ( <i>p</i> > 0,05)	410,1 ± 12,3 ( <i>p</i> > 0,05)
20 мин	120,8 ± 9,1 ( <i>p</i> > 0,05)	91,5 ± 5,6 ( <i>p</i> > 0,05)	404,4 ± 7,1 ( <i>p</i> > 0,05)
30 мин	122,8 ± 7,4 ( <i>p</i> > 0,05)	89,6 ± 4,6 ( <i>p</i> > 0,05)	408,3 ± 16,7 ( <i>p</i> > 0,05)
40 мин	126,0 ± 8,1 ( <i>p</i> > 0,05)	89,8 ± 2,8 ( <i>p</i> > 0,05)	398,8 ± 9,5 ( <i>p</i> > 0,05)
50 мин	123,5 ± 6,1 ( <i>p</i> > 0,05)	91,3 ± 5,8 ( <i>p</i> > 0,05)	395,6 ± 13,9 ( <i>p</i> > 0,05)
60 мин	125,3 ± 5,5 ( <i>p</i> > 0,05)	89,5 ± 4,7 ( <i>p</i> > 0,05)	408,5 ± 16,0 ( <i>p</i> > 0,05)
70 мин	126,0 ± 4,9 ( <i>p</i> > 0,05)	89,1 ± 5,0 ( <i>p</i> > 0,05)	402,5 ± 7,5 ( <i>p</i> > 0,05)
80 мин	124,5 ± 9,3 ( <i>p</i> > 0,05)	90,8 ± 5,8 ( <i>p</i> > 0,05)	397,0 ± 15,9 ( <i>p</i> > 0,05)
90 мин	125,0 ± 8,6 ( <i>p</i> > 0,05)	91,5 ± 4,5 ( <i>p</i> > 0,05)	406,5 ± 9,9 ( <i>p</i> > 0,05)

Примечания: САД — систолическое артериальное давление; ДАД — диастолическое артериальное давление; ЧСС — частота сердечных сокращений. *p* — по сравнению с исходным уровнем.

почти на том же уровне вплоть до 90 мин действия препарата, превышая значения, полученные на фоне окклюзии примерно на 40,2 %.

При увеличении дозы никотиноил-L-пролина до 20 мг/кг выяснилось, что исследуемое соединение в указанной дозе не оказывает существенного влияния на мозговое кровообращение. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что введение NLP в дозе 20 мг/кг не сопровождается статистически значимыми изменениями ЛМК по сравнению с уровнем кровотока, зарегистрированным после ОЛСА до введения препарата.

Таким образом, полученные результаты экспериментального исследования позволяют утверждать, что NLP обладает способностью увеличивать нарушенный в условиях острой ишемии церебральный кровоток. Примечательно, что зависимость доза — эффект данного препарата носит куполообразный характер, при этом эффективной дозой NLP с цереброваскулярной активностью является доза 10 мг/кг.

Располагая данными относительно способности NLP стимулировать ЛМК, нарушенный в условиях острой ишемии, цереброваскулярные эффекты препарата были исследованы также и в экспериментальной модели хронической ишемии в условиях гипокинезии, вызванной ограничением двигательной активности животных продолжительностью 15 сут.

На основании данных, полученных при острой ишемии, влияние NLP на церебральный кровоток при хронической ишемии изучалось в дозе 10 мг/кг. Проведенные исследования показали, что способность препарата улучшать кровоснабжение мозга проявляется и на фоне хронической ишемизации мозговой ткани. Как видно из рисунка, через 40 мин после внутрибрюшинного введения NLP животным на фоне гипокинезии, вызванной ограничением двигательной активности продолжительностью 15 дней, кровоток в коре головного мозга гипокинетичных крыс начинает расти и достигает своего максимального значения к 70 мин введения препарата, превышая исходный уровень регистрируемого показателя примерно на 41 %. При этом эффект NLP продолжает сохраняться даже спустя 90 мин после инъекции.

Регистрация показателей систолического и диастолического артериального давления крыс (САД и

ДАД), а также ЧСС после внутрибрюшинного введения NLP в дозе 10 мг/кг свидетельствует о том, что цереброваскулярные эффекты NLP не сопровождаются какими-либо изменениями показателей артериального давления (см. табл. 2).

Таким образом, исследование по изучению цереброваскулярных эффектов нового синтезированного соединения никотиноил-L-пролина показало, что NLP обладает способностью стимулировать нарушенный мозговой кровоток как при острой, так и хронической ишемии мозга с оптимальной цереброваскулярной активностью в дозе 10 мг/кг. Полученные данные являются основой для дальнейшего изучения исследуемого соединения, а также его производных с целью создания нового перспективного средства коррекции нарушенного кровоснабжения мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. B. Sui, P. Gao, *Int. J. Med. Res.*, **48**(1), 1 – 5 (2020).
2. H. Xiaoming, T. M. De Silva, J. Chen, et al., *Circ. Res.*, **120**(3), 449 – 471 (2017).
3. X. Tong, Q. Yang, M. D. Ritchey, et al., *Prev. Chronic Dis.*, **16**, 1 – 9 (2019).
4. B. Avula, A. G. Chittiboyina, S. Sagi, et al., *Drug Test. and Analysis*, **8**(3 – 4), 334 – 343 (2015).
5. P. У. Островская, Т. А. Гудашева, Т. А. Воронина, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **65**(5), 66 – 72 (2002).
6. И. В. Силкина, Т. С. Ганьшина, С. Б. Середенин, Р. С. Мирзоян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **68**(1), 20 – 24 (2005).
7. AR Patent No. 3372 A; AM 20190142 (2020).
8. J. Gomes-Osman, D. F. Cabral, C. Hinchman, et al., *Restor. Neurol. Neurosci.*, **35**(5), 547 – 556 (2017).
9. В. П. Хакобян, *Гипокинезия и мозговой кровоток*, Медицина, Москва (1999), сс. 120 – 151.
10. National Research Council, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, The National Academies Press, Washington DC (2011).
11. V. V. Alexandrin, *Methodology of Flowmetry*, **4**, 139 – 144 (2000).
12. И. В. Федоров (ред.), *Проблемы космической биологии*, **44**, Наука, Москва (1982).
13. Y. Wang, S. E. Thatcher (ed.), L. A. Cassis, *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, Vol. 1614, Methods Mol. Biol., Springer Science + Business Media LLC (2017), pp. 69 – 73.

Поступила 22.06.21

## SYNTHESIS AND CEREBROVASCULAR ACTIVITY OF NICOTINOYL-L-PROLINE

I. H. Aghamalyan<sup>1,\*</sup>, S. T. Karamyan<sup>1</sup>, and M. G. Balasanyan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M. Heratsi Yerevan State Medical University, 0025 Yerevan, Armenia

\* e-mail: iskuhi.hamletovna@mail.ru

We have revealed the cerebrovascular activity of the new synthesized compound nicotinoyl-L-proline in rats under the conditions of acute ischemia caused by the left carotid artery occlusion and chronic ischemia of the brain caused by hypokinesia of animals. Using the method of laser Doppler flowmetry, it was found that the intraperitoneal injection of investigated nicotinoyl-L-proline at a dose of 10 mg/kg stimulated local cerebral blood flow by more than 40 % under the conditions of acute brain ischemia and against the background of chronic ischemia caused by the animal hypokinesia during 15 days. Registration of the systemic arterial pressure by noninvasive “tail-cuff” method demonstrated that the effects of nicotinoyl-L-proline on the cerebral blood flow were not accompanied by changes in the systolic and diastolic pressures and in the heart rate.

**Keywords:** nicotinoyl-L-proline; brain blood flow; cerebral ischemia; hypokinesia.