

Суфианова Г.З.<sup>1</sup>, Шапкин А.Г.<sup>1,2</sup>, Хлесткина М.С.<sup>1</sup>,  
Суфианов А.А.<sup>2,3</sup>

УДК 615.03:616.831-005.4.  
DOI 10.25694/URMJ.2018.04.130

## Нейропротекторная активность цитиколина при профилактическом введении в эксперименте

1. ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень; 2. ФГБУ Федеральный центр нейрохирургии Минздрава России, г. Тюмень; 3. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва;

Sufianova G.Z., Shapkin A.G., Khlestkina M.S., Sufianov A.A.

### Neuroprotective activity of citicoline in prophylactic injection in experiment

#### Резюме

**Цель исследования.** Провести сравнительную неврологическую оценку нейропротекторной активности цитиколина при профилактическом и лечебном введении на модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс. **Материалы и методы.** Работа выполнена на 51 беспородных крысах-самцах, весом 180-220 гр. Исследовали эффективность в/б введения цитиколина (2000 мг/кг) при моделировании 60 минутной интравазальной окклюзии левой СМА при профилактическом однократном и ежедневном лечебном назначении. Оценку неврологического дефицита во всех экспериментальных группах осуществляли до ишемии и в последующие 5 суток с применением 4х бальной шкалы Бедерсона и шкалы оценки неврологических нарушений McGraw с модификациями Ohno. **Результаты.** Интраваскулярная окклюзия левой СМА сопровождалась неврологическими нарушениями различной степени выраженности у экспериментальных животных всех групп. При этом, ежедневное (лечебное) назначение ЦДФ холина в постишемическом периоде не сопровождалось статистически значимым улучшением неврологического статуса у крыс в сравнении с контрольной группой. Наиболее существенное защитное действие цитиколина по данным неврологического тестирования отмечалось при его однократном профилактическом введении до ишемии. **Заключение.** Цитиколин при профилактическом введении обладает выраженной нейропротекторной активностью при ишемии головного мозга, что проявляется значительно меньшим неврологическим дефицитом и летальностью экспериментальных животных в сравнении с контрольной группой.

**Ключевые слова:** цитиколин, ишемия головного мозга, нейропротекция

#### Summary

**Objective.** To perform a comparative neurological assessment of neuroprotective activity of citicoline in a prophylactic and therapeutic injection on the model of focal brain ischemia in rats. **Materials and Methods.** The study was performed on 51 male rats with weight 180-220 g. We studied the potential of preventative single injection and daily therapeutic injection of citicoline (2000 mg/kg) on the model of 60-minute intravasal occlusion of the left MCA. Assessment of neurological deficit in all experimental groups was performed before ischemia and the next 5 days after using the 4-point Bederson scale and the McGraw Stroke Index scale with Ohno modifications. **Results.** Intravascular occlusion of the left MCA was followed by neurologic disorders of different severity in experimental animals of all groups. At the same time, daily (therapeutic) use of CDP-choline in the postischemic period was not followed by statistically significant improvement in neurological status in rats compared with control group. The most significant protective effect of citicoline, according to neurological test, was marked in cases with single prophylactic injection before ischemia. **Conclusion.** Prophylactic injection of citicoline possesses a pronounced neuroprotective activity in case of cerebral ischemia, which is manifested by significantly smaller number of cases with neurologic deficit and lethality of experimental animals in comparison with control group.

**Key words:** citicoline, cerebral ischemia, neuroprotection

#### Введение

Повреждение ЦНС ишемического генеза занимает лидирующие позиции среди причин заболеваемости,

смертности и инвалидизации в мире, оставаясь ведущим патологическим состоянием в нейрохирургической и неврологической практике, что определяет необходимость

Таблица 1. Шкала оценки неврологических нарушений McGraw [12] с модификациями Ohno K. [13]

№	Неврологический симптом	Индекс повреждения (баллы)
1	Взъерошенность волосяного покрова или тремор	1
2	Пригипсовые чувствительности, вялость, замедленность движений	1
3	Изменения слуха (прижатие ушей)	1
4	Запрокидывание головы	3
5	Птоз	2
6	Парез конечностей	3
7	Маневренные движения	3
8	Судороги или двигательная гиперактивность	3
9	Коматозное состояние	6

поиска новых нейропротекторных препаратов [1 2 3]. Высокая социальная значимость определяет необходимость разработки новых лекарственных средств и методов предупреждения и коррекции ишемических повреждений нервной ткани [3, 4]. Перспективным лекарственным препаратом для предупреждения и лечения ишемических нарушений различной этиологии является цитиколин (цитидин-5'-дифосфохолин, ЦДФ-холин) [5, 6, 7, 8, 9]. Применение данного препарата в клинической практике входит в основные стандарты лечения острой сосудистой патологии головного мозга, в основном уже в постишемическом периоде. Профилактическое защитное действие цитиколина практически не исследовано. Также, не достаточно изучены механизмы нейропротекторной активности этого препарата.

#### **Цель исследования**

Провести сравнительную неврологическую оценку нейропротекторной активности цитиколина при профилактическом и лечебном введении на модели фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс.

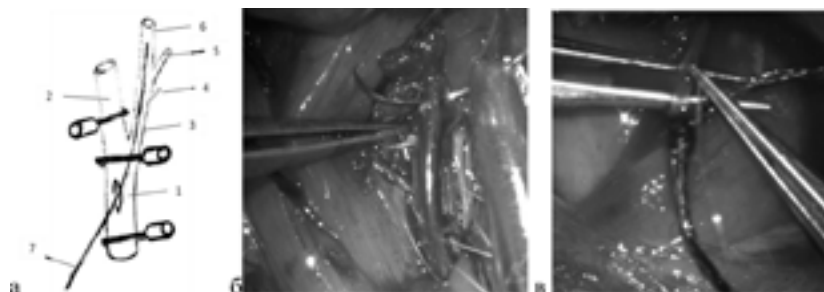
#### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 51 здоровых беспородных крысах-самцах, весом 180-220 гр. До экспериментов животных содержали в лабораторном виварии при температуре помещения 18-22 оС и естественном световом режиме; использовали стандартную диету, состоящую из брикетированного корма, овощей и воды. Опыты на животных проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР N 755 от 12.08.1977 г.). Инвазивные процедуры (моделирование ишемии головного мозга) осуществлялись под адекватным обезболиванием (золетил-100, 7,5 мг/кг, внутривенно). Животные были случайным образом разделены на 4 экспериментальные группы. В первой, ложнооперированной группе (n=8) выполнялся оперативный доступ к брахицефальным артериям без последующего моделирования ишемии головного мозга. Вторая, контрольная группа (N=17), была представлена животными, у которых моделировали транзиторную 60 минутную ишемию головного мозга путем внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии по разработанной нами методике (патент на изобретение RU2639787C1). Основная экспериментальная группа была разделена на две подгруппы: в первой (N=14)- сра-

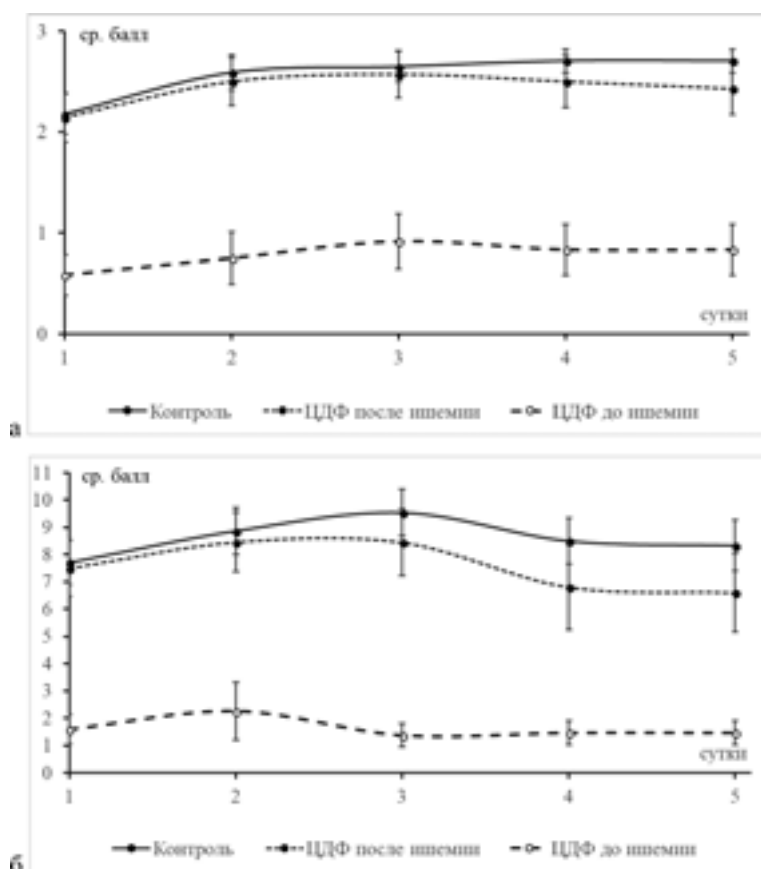
зу после реперфузии в/б вводили 2000 мг/кг цитиколина с последующим ежедневным в/б назначением данного препарата в аналогичной дозировке («лечебное» назначение); во второй подгруппе (N=12) цитиколин (2000 мг/кг) вводился однократно, с учетом литературных данных о фармакокинетике цитиколина [10], за 60 минут до окклюзии СМА («профилактическое» назначение).

Оценку неврологического дефицита проводили до ишемии и в последующие 5 суток после моделирования повреждения с применением известных неврологических тестов: 4х бальной шкалы Бедерсона [11] (0 – норма, 1 – умеренное расстройство, 2 – выраженное расстройство, 3 – грубые нарушения, хождение по кругу) и шкалы оценки неврологических нарушений McGraw [12] с модификациями Ohno K. [14]. При использовании шкалы McGraw интегральная оценка неврологического дефицита выполнялась путем суммирования баллов согласно выявленным нарушениям (таблица 1). У крыс оценивали расстройства чувствительности, нарушение произвольных движений, координации, выпадение рефлексов.

С целью моделирования ишемии головного мозга у крыс производилось выделение общей, внутренней и наружной сонных артерий слева и общей сонной артерии справа (рис. 1а). Для предупреждения проведения окклюдера в систему наружной сонной артерии (НСА), выполняли предварительную перевязку левой НСА (рис. 1б). Ниже места предполагаемого введения окклюдера перевязывали левую общую сонную артерию (ОСА), затем, иглой с круглым сечением перфорировали стенку данного сосуда чуть выше места перевязки. Через вкол в ОСА вводился окклюдер, который медленно проводили на глубину 15-20 мм по ходу общей и внутренней сонных артерий к средней мозговой (СМА) (рис. 1в). Окклюдер фиксировали в сосуде путем наложения временной клипсы на ОСА выше места перфорации стенки сосуда. Дополнительно, с целью снижения общей перфузии головного мозга и повышения воспроизводимости модели, клипировали ОСА с противоположной стороны. Через 60 минут окклюдер извлекался и выше места прокола стенки сосуда и введения окклюдера выполнялась перевязка ОСА. Также восстанавливали кровоток по ОСА с противоположной стороны. Для изготовления окклюдера использовался доступный синтетический рассасывающийся монофиламентный шовный материал на основе полигликона (Саргосун). Нить (Саргосун 5.0) нарезали на



**Рис.1.** Схема интраваскулярной окклюзии СМА (а) и основные этапы моделирования ишемии головного мозга: б – выделение и перевязка общей сонной и наружной сонной артерий; в – введение окклюдера через общую сонную артерию: 1 – общая сонная артерия; 2 – наружная сонная артерия; 3 – внутренняя сонная артерия; 4 – *a. ophthalmica*; 5 – передняя мозговая артерия; 6 – средняя мозговая артерия; 7 – окклюдер.



**Рис. 2.** Динамика неврологического дефицита с использованием теста Бедерсона (а) и шкалы оценки неврологических нарушений McGraw с модификациями Ohno (б) в течение первых 5 суток наблюдения после 60-минутной окклюзии левой СМА: «Контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «ЦДФ после ишемии» - первая основная экспериментальная подгруппа (ежедневное в/б введение цитиколина (2000 мг/кг) в постишемическом периоде); «ЦДФ до ишемии» - вторая основная экспериментальная подгруппа (однократное профилактическое в/б введение ЦДФ-холина (2000 мг/кг) за 60 минут до окклюзии СМА).

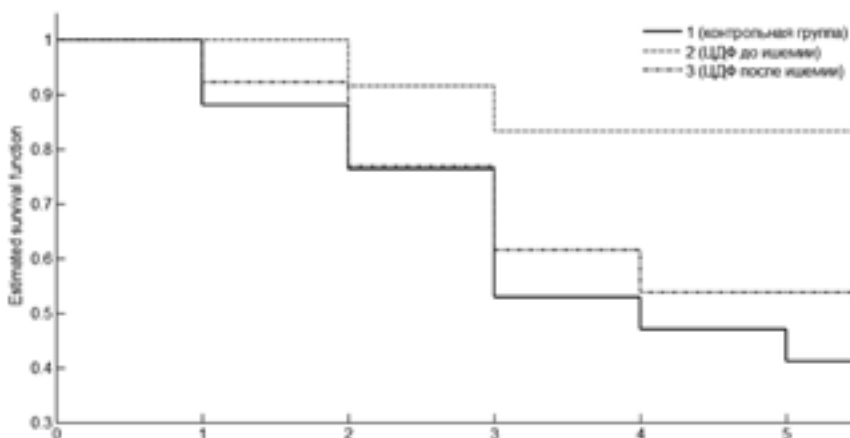
фрагменты по 30 мм. Для удобства оценки глубины введения окклюдера, на нарезанных фрагментах нити, с использованием перманентного маркера, устанавливались специальные отметки, фиксирующие дистанцию в 15 и 20 мм.

Для оценки статистической значимости полученных результатов использовались непараметрические критерии S–Уилкоксона и U–Манна–Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Совокупные частоты возникновения и показатели выживания оценивались с помощью

методов Каплана–Мейера. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где M — среднее арифметическое, а m — стандартная ошибка средней.

## Результаты и обсуждение

При моделировании транзиторной фокальной ишемии головного мозга у всех крыс контрольной группы выявлялись типичные неврологические признаки ишемического повреждения головного мозга - гиподинамия, правосторонний гемипарез, атаксия. У 6 из 17 крыс (35,3%)



**Рис. 3.** Кривая выживаемости Каплан-Мейера после моделирования ишемии головного мозга: «Контроль» - контрольная группа (моделирование ишемии головного мозга); «ЦДФ после ишемии» - первая основная экспериментальная подгруппа (ежедневное в/б введение цитиколина (2000 мг/кг) в постишемическом периоде); «ЦДФ до ишемии» - вторая основная экспериментальная подгруппа (однократное профилактическое в/б введение ЦДФ-холина (2000 мг/кг) за 60 минут до окклюзии СМА).

данной группы дополнительно определялись признаки нарушения кровоснабжения тканей глазного яблока с соответствующей стороны, связанные вероятно с окклюзией а. Ophthalmica. Средний неврологический балл по шкалам Бедерсона и McGraw за все 5 суток наблюдения у крыс контрольной группы составлял соответственно  $2,5 \pm 0,1$  и  $9,3 \pm 0,7$  (рис. 2). Данные изменения существенно отличались от проявлений неврологического дефицита у крыс ложнооперированной серии, где умеренный неврологический дефицит, связанный с ранним послеоперационным угнетением двигательной активности экспериментальных животных, выявлялся только с использованием шкалы McGraw у 3х животных из 8 в первые 2 суток после операции, и в среднем, за первые 5 суток составлял  $0,25 \pm 0,1$ . Неврологические нарушения выявляемые с использованием различных шкал у ишемизированных крыс в значительной степени коррелировали с друг другом ( $r=0,93$ ,  $P<0,01$ ). Общая летальность животных при моделировании транзиторной 60 минутной фокальной ишемии головного мозга составила  $58,8 \pm 12,7\%$ , средняя продолжительность жизни крыс контрольной группы с учетом выведения их из эксперимента на 5 сутки –  $3,6 \pm 0,5$  суток. Корреляция летальности с суммарными неврологическими нарушениями, выявляемыми по шкалам Бедерсона и McGraw составляла соответственно  $0,57$  ( $P<0,05$ ),  $0,65$  ( $P<0,05$ ).

У крыс первой основной экспериментальной подгруппы, на фоне ежедневного в/б введения цитиколина, несмотря на некоторую тенденцию к более низким значениям показателей, существенных отличий неврологических проявлений и общей летальности от контрольной группы не наблюдалось. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у крыс данной группы в первые 5 суток эксперимента составлял соответственно  $2,4 \pm 0,2$  и  $8,8 \pm 0,9$ . Общая летальность крыс первой основной подгруппы составила  $42,9 \pm 0,1\%$ , средняя продолжительность жизни на  $8,3\%$  превышала аналогичные значения в контрольной группе и составляла  $3,9 \pm 0,4$  дня.

Наиболее значимый нейропротекторный эффект цитиколина по данным неврологического тестирования наблюдался при его однократном профилактическом назначении за 60 минут до ишемии у крыс второй основной экспериментальной подгруппы. Средний неврологический балл с использованием шкал Бедерсона и McGraw у животных данной группы за 5 суток наблюдения составлял соответственно  $0,8 \pm 0,2$  и  $2,1 \pm 0,8$  ( $P<0,01$  в сравнении с контрольной группой и первой основной подгруппой) (рис. 2). В данной группе наблюдалась минимальная летальность – за все время эксперимента погибло 2 из 12 крысы на 1 и 3 сутки наблюдения, общая летальность составила  $16,7 \pm 11,7\%$  ( $P<0,01$  в сравнении с контрольной группой и первой основной подгруппой), а средняя продолжительность жизни  $4,6 \pm 0,3$  дня ( $P<0,05$ ).

Отсутствие существенной разницы между продолжительностью жизни животных контрольной и первой основной групп и выраженное снижение летальности во второй экспериментальной подгруппе отчетливо видно при построении кривой Каплан-Мейера (рис. 3).

Традиционно, основные пути патогенетически направленной терапии различных нарушений при ишемическом повреждении нервной ткани были сосредоточены на коррекции церебральной гемодинамики. В то же время, данный подход не позволяет решить всех проблем лечения вторичных ишемических повреждений и имеет определенные ограничения, связанные с воздействием только на сосудистый компонент патогенеза инсульта [3], поэтому в настоящее время внимание исследователей и врачей привлекают лекарственные препараты с плеiotропными эффектами: нейрорепаративным, нейропротективным и возможностью модулировать механизмы нейропластичности [5, 14]. Целевым воздействием на ключевые звенья патогенеза повреждения нервной ткани сосудистого, травматического, токсического или другого генеза из группы нейропротекторов обладает препарат цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин, ЦДФ-холин), являющийся естественным метаболитом, играющим важ-

ную роль в синтезе фосфолипидов [5, 6]. В последние годы ЦДФ-холин является объектом особого интереса как эффективное нейропротекторное средство [5, 6, 9, 15]. В частности, во множестве экспериментальных исследованиях было обнаружено, что этот препарат предотвращает повреждение нервных клеток на различных моделях ишемии головного мозга [6, 7, 8]. Данные экспериментов на животных были неоднократно подтверждены во многих клинических исследованиях [5, 9]. При этом было установлено, что наиболее раннее назначение цитиколина при острых нарушениях мозгового кровообращения существенно улучшает функциональные исходы и реабилитацию пациентов [9, 16]. Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных оценке защитного действия данного препарата при церебральной ишемии, механизмы действия ЦДФ-холина рассматриваются преимущественно в рамках его влияния на синтез фосфолипидов в мембранах нейронов при лечебном, постишемическом назначении [7, 10]. Предполагается, что ЦДФ-холин является пролекарством, которое после приема последовательно гидролизуется и дефосфорилируется до цитидина, уридина и холина, затем эти метаболиты по отдельности попадают в ткани мозга и используются для ресинтеза ЦДФ-холина, который поддерживает биосинтез клеточных фосфолипидов [10]. Необходимо отметить ничтожно малое количество экспериментальных исследований, посвященных изучению нейропротекторной активности цитиколина при профилактическом (до ишемии) назначении [8, 17].

Как видно из полученных в нашем исследовании результатов, при назначении ЦДФ холина в постишемическом периоде практически не отмечается улучшение неврологического дефицита в сравнении с контрольной группой. Данное расхождение с результатами исследований других авторов возможно связаны с тем, что препарат вводился в относительно короткий период, в то время как для оценки репаративных эффектов требуется более длительное время [10]. Выраженное защитное действие

ЦДФ-холина при однократном профилактическом назначении нельзя однозначно объяснить его влиянием на синтез фосфолипидов. Логичным объяснением может быть активация метаболитами ЦДФ холина (в частности, уридином) специфических пиримидиновых P2Y рецепторов на мембранах нервных клеток [9, 18, 19]. Однако данное предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

## Выводы

1. Цитиколин при профилактическом введении обладает выраженной нейропротекторной активностью при фокальной транзиторной ишемии головного мозга, что проявляется значительно меньшим неврологическим дефицитом и летальностью экспериментальных животных в сравнении с контрольной группой.

2. Ежедневное назначение цитиколина в раннем постишемическом периоде не вызывает существенного улучшения неврологических функций и не приводит к снижению летальности и удлинению продолжительности жизни ишемизированных животных. ■

*Суфианова Г.З., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России. Шапкин А.Г., к.м.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, врач-нейрохирург ФГБУ Федеральный центр нейрохирургии (г. Тюмень) Минздрава России. Хлѣсткіна М.С., старший преподаватель кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России. Суфианов А.А., д.м.н., профессор, главный врач ФГБУ Федеральный центр нейрохирургии (г. Тюмень) Минздрава России, заведующий кафедрой нейрохирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автор, ответственный за переписку - Суфианова Г.З., 625023 г. Тюмень, ул. Одесская, 54, Кафедра фармакологии Тел. 8(3452)200534, e-mail: sufarm@mail.ru*

---

## Литература:

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта. *Нервные болезни*. 2002; 1: 3-7.
2. Стаховская Л.В., Клочихина О.А., Богатырева М.Д., Коваленко В.В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009-2010). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013; 113(5):4-10.
3. Суфианова Г.З., Шапкин А.Г. Повреждение нервной ткани: механизмы, модели, методы оценки. М: Издательство РАМН; 2014.
4. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А., Шапкин А.Г., Раевская Л.Ю. Защитное действие циклопентиладенозина на малоинвазивной модели острой фокальной ишемии головного мозга у крыс // *Эксп. и клин. фарм.* 2002; 65(1): 24-6.
5. Alvarez-Sabín J., Román G.C. The role of citicoline in neuroprotection and neurorepair in ischemic stroke. *Brain Sci*. 2013; 3(3):1395-414.
6. Bustamante A., Giral D., Garcia-Bonilla L. et al. Citicoline in pre-clinical animal models of stroke: a meta-analysis shows the optimal neuroprotective profile and the missing steps for jumping into a stroke clinical trial. *J Neurochem*. 2012; 123(2): 217-25.
7. Diederich K., Frauenknecht K., Minnerup J. et al. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats. *Stroke*. 2012; 43(7): 1931-40.
8. Hurtado O., Moro M.A., Cárdenas A. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis*. 2005; 18(2):

- 336-45.
9. Мушба А.В., Иванова Д.С., Виноградов О.И. Влияние цитиколина на эффективность восстановительных мероприятий у больных с ишемическим инсультом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016;116(2):71-75.
  10. Grieb P. *Neuroprotective Properties of Citicoline: Facts, Doubts and Unresolved Issues*. *CNS Drugs*. 2014; 28(3): 185-93.
  11. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986; 17(3): 472-6.
  12. McGraw C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. *Arch Neurol*. 1977;34(6): 334-6.
  13. Ohno K., Ito U., Inaba Y. Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil. *Brain Res*. 1984; 297(1):151-7.
  14. Cansev M., Minbay Z., Goren B. et al. Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurosci Lett*. 2013;542: 65-70.
  15. Secades J.J., Frontera G. CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1995; 17(Suppl B):1-54.
  16. Cotroneo A.M., Castagna A., Putignano S. et al. Effectiveness and safety of citicoline in mild vascular cognitive impairment: the IDEALE study. *Clin Interv Aging*. 2013; 8:131-7.
  17. Mir C., Clotet J., Aledo R. et al. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. *J Mol Neurosci*. 2003;20(1): 53-60.
  18. Koyuncuoglu T., Turkyilmaz M., Goren B. et al. Uridine protects against hypoxic-ischemic brain injury by reducing histone deacetylase activity in neonatal rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2015;33(5):777-84.
  19. von Kügelgen I., Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*. 2016; 104:50-61.