

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Муровец В.О., Ленцман М.В.

## Бензиловый эфир креатина эффективен для профилактики и лечения неврологических и когнитивных нарушений при фокальной ишемии головного мозга у крыс

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»,  
199034, Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6

**Введение.** Ишемический инсульт головного мозга является одной из главных причин преждевременных смертей во всем мире, вызванные им когнитивные и функциональные нарушения ведут к инвалидизации. Для клинического использования в настоящее время одобрено лишь одно средство – рекомбинантный активатор плазминогена, который обеспечивает восстановление (реканализацию) мозгового кровотока. Средства эффективной нейропротекции, обеспечивающие непосредственную защиту нейронов от ишемии (предотвращение апоптоза, сохранение функциональной активности), несмотря на огромное число исследований, по-прежнему не найдены. Поиск новых подходов к профилактике и лечению острых нарушений мозгового кровообращения по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Цель исследования – изучение влияния бензилового эфира креатина, нового синтетического соединения, обладающего способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и осуществлять нейропротекторное действие на неврологические и когнитивные нарушения, вызванные фокальной ишемией головного мозга у крыс линии Спрэг-Доули.

**Методика.** Фокальную ишемию головного мозга (ФИМ) индуцировали путем хронической окклюзии левой средней мозговой артерии (СМА) в соответствии с модификацией методики А. Tamura и соавт., 1981. Использовали комбинированный наркоз: Золетил/Домитор (внутрибрюшинно (в/б) по 50 мг/кг и 0.2 мг/кг, соответственно), температуру тела поддерживали постоянной на уровне  $38 \pm 0.5$  °С. Окклюзию СМА производили путем биполярной высокочастотной электрокоагуляции (аппарат ЭХВЧ-25-11-С, «Медия», Россия) наиболее проксимального участка артерии, начиная с 0.5 мм от места ее отхождения от Виллизиева круга и на протяжении 2–3 мм. Процедура имитации ишемии (ложная операция) была аналогична вышеизложенной, но без электрокоагуляции СМА. Оценку степени неврологических нарушений проводили с использованием неврологической шкалы Гарсии и модифицированной шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН) последовательно за 1 сут до и через 1, 3 и 7 сут после моделирования ФИМ. Для выявления когнитивных нарушений использовали водный лабиринт Морриса. Стандартный тест исследования процессов обучения и памяти применяли в версии для оценки пространственной референтной памяти, заключающейся в поиске животным скрытой под водой платформы при ориентации только по приметам окружающей обстановки. Бензиловый эфир креатина вводили внутрибрюшинно трижды – за 3, 2 и 1 ч до фокальной ишемии при профилактическом применении, либо через 1, 2 и 3 ч после моделирования ишемии при лечебном применении.

**Результаты.** Получены приоритетные данные о том, что бензиловый эфир креатина при профилактическом введении эффективно предупреждает развитие неврологических нарушений и ослабляет когнитивные нарушения после фокальной ишемии мозга; при лечебном применении препарат ослабляет тяжесть неврологических нарушений и снижает выраженность когнитивных расстройств.

**Заключение.** Результаты исследования позволяют рекомендовать данное производное креатина (после оценки возможной токсичности) для проведения первой фазы клинических испытаний в качестве препарата противоишемического действия.

**Ключевые слова:** фокальная ишемия мозга; креатин; аналоги креатина; водный лабиринт Морриса; неврологические шкалы; крысы

**Для цитирования:** Муровец В.О., Ленцман М.В. Бензиловый эфир креатина эффективен для профилактики и лечения неврологических и когнитивных нарушений при фокальной ишемии головного мозга у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(1): 35-41.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.35-41

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование – Ленцман М.В., Муровец В.О.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Муровец В.О.

**Для корреспонденции:** Ленцман Михаил Валерьевич, e-mail: MLensman@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014-2020 годы (ГП-14, раздел 64).

**Благодарность.** Авторы благодарят канд. биол. наук Артемьеву А.И. за неоценимую помощь в операционной подготовке животных и доктору хим. наук Буровой С.В. с коллегами из ФГБУН Институт Высокмолекулярных соединений РАН за синтез и предоставление для исследований бензилового эфира креатина.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.06.2020

Принята к печати 21.01.2021

Опубликована 10.03.2021

**Murovets V.O., Lentsman M.V.**

## **Creatine benzyl ester is effective for prevention and treatment of neurological and cognitive disorders caused by focal cerebral ischemia in rats**

I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Science,  
Naberezhnaya Makarova 6, Saint Petersburg 199034, Russian Federation

**Background.** Ischemic stroke is one of the main causes for premature death worldwide. Cognitive and functional disorders induced by stroke result in disability. Currently, only one agent has been approved for the clinical use, recombinant plasminogen activator, which provides recovery (recanalization) of cerebral blood flow. Despite numerous studies, an effective treatment to protect directly neurons from ischemia (preventing apoptosis, maintaining functional activity) has not been found so far. Thus, search for new approaches to prevention and treatment of acute cerebrovascular accidents remains one of the most pressing challenges of modern medicine.

**The aim** of this work was to study the effect of creatine benzyl ester, a new synthetic compound capable for penetrating the blood-brain barrier to provide neuroprotection, on neurological and cognitive disorders induced by focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats.

**Methods.** Focal cerebral ischemia was induced by chronic occlusion of the left middle cerebral artery (MCA) by a A. Tamura et al. (1981) modified method. Combined intraperitoneal (i.p.) anesthesia with Zoletil/Domitor (50 mg/kg and 0.2 mg/kg, respectively) was used. Body temperature was maintained at  $38\pm 0.5$  °C. MCA occlusion was performed by bipolar high-frequency electrocoagulation (EKVCh-25-11-C, Media, Russia) of the most proximal part of the artery, from 0.5 mm from the place where it originates from the circle of Willis and over 2–3 mm. The sham ischemia procedure was similar to that described above but without MCA electrocoagulation. Severity of neurological disorders was assessed with the Garcia neurological scale and a modified scale for severity of neurological disorders (OTTN) one day before and at 1, 3, and 7 days following ischemia. Cognitive impairment was assessed with the Morris water maze, a standard test for learning and memory. This test was used in a version for studying spatial reference memory, which consists of finding a platform hidden under the water by the animal guided only by surrounding marks. Creatine benzyl ester was injected i.p. three times, 3, 2 and 1 h before focal ischemia for prevention or 1, 2 and 3 h after ischemia for treatment.

**Results.** The study produced priority data showing that preventive administration of creatine benzyl ester effectively abolished the development of neurological disorders and alleviated the cognitive impairment after focal cerebral ischemia whereas the therapeutic treatment restricted the severity of neurological and cognitive disorders.

**Conclusion.** The results of the study supported recommendation of this creatine derivative (after assessing potential toxicity) for the first phase of clinical trials as an anti-ischemic drug.

**Keywords:** focal cerebral ischemia; creatine; creatine analogs; Morris water maze; neurological scales; rats

**For citation:** Murovets V.O., Lentsman M.V. Creatine benzyl ester is effective for prevention and treatment of neurological and cognitive disorders caused by focal cerebral ischemia in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2021; 65(1): 35-41. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.35-41

**Contribution:** study concept and design, material collection and processing, text writing, editing – Lentsman M. V., Murovets V.O.; preparation of illustrations, statistical analysis – Murovets V.O.

**For correspondence:** **Michael V. Lentsman**, MD, PhD, Senior Research Scientist, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Science»; Nab. Makarova, 6, 199034, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: mlensman@yandex.ru

**Gratitude.** The authors are grateful to Ph.D. Artemieva A.I. for invaluable assistance in the operational preparation of animals and Ph.D. Burov S.V. with colleagues from the Institute of High Molecular Compounds, Russian Academy of Sciences, for the synthesis and provision of creatine benzyl ester for research.

**Acknowledgment.** This study was supported by the Program of Basic Research of State Academies, 2014-2020 (GP-14, part 64).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Murovets V.O., <https://orcid.org/0000-0001-5741-1562>

Lentsman M.V., <https://orcid.org/0000-0003-2296-3687>

Received 03.06.2020

Accepted 21.01.2021

Published 10.03.2021

## Введение

Частота встречаемости инсульта растет в мире с каждым годом. Ишемический инсульт — одна из главных причин преждевременной смерти и инвалидизации людей. Вызванные инсультом когнитивные и функциональные нарушения существенно снижают качество жизни [1]. Поиск новых подходов к профилактике и лечению острых нарушений мозгового кровообращения по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [2, 3]. Для клинического применения одобрено средство — рекомбинантный активатор пламиногена (IV-tPA и аналоги), который обеспечивает восстановление мозгового кровотока [4, 5]. При всех достоинствах препарата, он зачастую не может обеспечить полноценную реперфузию и уменьшить тяжесть поражения в области формирующегося инфаркта мозга [6, 3]. Несмотря на огромное число исследований [2, 3] средства эффективной нейропротекции, по-прежнему не найдены,

Известно, что развитие необратимого поражения нервной ткани при ишемии в значительной степени связано с падением уровня высокоэнергетических фосфатов (АТФ и креатинфосфата) [7]. Поскольку креатинфосфат способен поддерживать ресинтез АТФ из АДФ при ишемии, наращивание пула мозгового креатинфосфата за счет введения его предшественника, креатина, представляется весьма перспективным способом нейропротекции. В опытах *in vitro* на переживающих срезах мозга эта гипотеза уже нашла подтверждение [8, 9]. Возможность достижения этого простым увеличением содержания креатина в пище наталкивается на чрезвычайно низкую проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для креатина [10–12], и, хотя ряд авторов действительно наблюдали увеличение уровня креатинфосфата и нейропротекторный эффект на модели ишемии при длительном кормлении животных креатином [13, 14], это скорее может объясняться выявленным стимулирующим эффектом креатина на ряд генов, ответственных за дифференцировку ткани [15].

Авторы ранее впервые показали, что предварительное интрацеребровентрикулярное введение 50 мМ раствора креатина эффективно предупреждает развитие неврологических нарушения и ослабляет когнитивные нарушения, вызванные глобальной ишемией головного мозга у крыс, а также обладает сильным нейропротекторным действием [16–18]. Поскольку такой спо-

соб введения очевидно непригоден для использования в клинике, дальнейшим развитием стало исследование производных креатина, обладающих потенциальной способностью прохождения через ГЭБ. Одним из таких препаратов был бензиловый эфир креатина (БЭКр), предложенный в патенте<sup>1</sup> ранее был протестирован в модели срезов гиппокампа. Было показано, что БЭКр хорошо проникает через мембрану нейрона независимо от специализированного транспортера креатина CRT и значимо увеличивает содержание креатина в ткани. Были получены также данные о том, что БЭКр обладает определенными противоишемическими свойствами<sup>2</sup>.

**Цель исследования** — оценка профилактической и лечебной эффективности БЭКр при неврологических и когнитивных нарушениях, вызванных экспериментальной фокальной ишемией головного мозга у крыс *in vivo*.

## Методика

Исследование проведено в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 и под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. В опытах использовали 48 самцов крыс (290–340 г) линии Спрэг-Доули (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН»). Животных содержали в лабораторном виварии в клетках Т4 по 4–5 особей при регулируемом световом (12/12 ч) и температурном режиме (22 °С), и свободном доступе к пище (гранулированный корм, «Волосово») и воде.

Фокальную ишемию головного мозга (ФИМ) индуцировали путем хронической окклюзии левой средней мозговой артерии (СМА) в соответствии с модификацией [19] методики [20]. Использовали комбинированный наркоз: Золетил/Домитор (внутрибрюшинно (в/б) по 50 мг/кг и 0.2 мг/кг, соответственно), температуру тела поддерживали постоянной на уровне 38±0.5. Окклюзию СМА производили путем биполярной высокочастотной электрокоагуляции (аппарат ЭХВЧ-25-11-С, «Медия», Россия) наиболее проксимального участка артерии, начиная от 0.5 мм от места ее отхождения от Виллизиева круга и на протяжении 2–3 мм. Процедура имитации ФИМ (ложная операция) была аналогична вышеизложенной, но без электрокоагуляции СМА.

Животным экспериментальных групп в/б вводили водный раствор гидрохлорида бензинового эфира кре-

<sup>1</sup>Vennerstrom J.L. and Miller D.W. Creatine ester pronutrient compounds and formulations. Patent WO0222135, USA; 2002.

<sup>2</sup>Поленов С.А. и соавт «Применение бензинового эфира креатина в качестве противоишемического препарата. Заявка на Росс. патент, МПК 7 А61К 31/661/2. – Приоритет 02.04.06].

атина, негативному ( $n=21$ ) и ложнооперированному контролю ( $n=5$ ) – физраствор. БЭКр (200 мг/кг) и физраствор вводили по 0.5 мл/кг трижды за 180, 120 и 60 мин до (режим профилактического применения,  $n=11$ ), или через 60, 120 и 180 мин (режим лечебного применения,  $n=9$ ) после моделирования ФИМ. Поскольку в водной среде БЭКр довольно быстро распадается на креатинин и бензол [19], каждый раз использовали свежеприготовленный раствор. Препарат готовили в соответствии с методикой, описанной [19].

Оценку степени неврологических нарушений проводили с использованием неврологической шкалы Гарсии [22] и модифицированной шкалы тяжести неврологических нарушений (ОТНН) [23] последовательно за 1 сут до ФИМ и через 1, 3 и 7 сут после. Шкала Гарсии включала 6 тестов спонтанной активности, асимметрии движений и соматосенсорной чувствительности. Увеличение итогового балла (3–18) соответствовало снижению выраженности нарушений. ОТНН выявляла неспособность выполнять отдельный тест из 4 основных групп тестов, оценивающих моторные и сенсорные асимметрии, сенсомоторные нарушения при балансировании на приподнятом горизонтальном стержне, отсутствие определенного рефлекса (мигательный, старт-рефлекс и т.д.). При этом увеличению балла (0–18) соответствовало увеличение тяжести нарушений. Для исследования когнитивных нарушений использовали водный тест (лабиринт) Морриса (ВТМ) [24] – стандартный тест для исследования процессов обучения и памяти [25, 26], в версии на исследование пространственной референтной памяти, заключающийся в поиске животным платформы, скрытой под водой, при ориентации только по приметам окружающей обстановки. Установка ВТМ представляла собой бассейн диаметром 145 см и высотой 50 см, заполненный на 25 см теплой водой ( $\approx 24$  °C), замутненной небольшим количеством мела. В центре одного из квадрантов (т.н. целевой квадрант) находилась платформа (диаметр 12 см, заглубление 1 см, в 25 см от стенки бассейна), положение которой не менялось в течение всего периода обучения. Бассейн располагался в отдельном помещении с достаточным количеством визуальных ориентиров на стенах, которое освещалось рассеянным светом двух 250 Вт ламп накаливания. Обучение в ВТМ проводили, начиная с 2-х сут после ФИМ, ежедневно в течение 6 сут, по четыре 120-секундных попытки с интервалом 30 с из 4 стартовых точек, варьирующихся в псевдослучайной последовательности. Между попытками крыса оставалась на платформе. Время поиска в блоке из 4 последовательных попы-

ток усредняли и использовали как обобщенный показатель «навигационных» способностей дня. На 6-е сут через 40–50 мин после последней попытки проводили так называемую пробную попытку, во время которой при изъятых платформах в течение двух минут производили видеорегистрацию поискового поведения животного. При последующем анализе видеозаписи определяли характеристики эффективности обучения: подсчитывали число пересечений места локализации платформы и с использованием оригинальной программы для приложения IMAQ Vision рассчитывали время, проведенное животным у стенок бассейна (в пределах аннулюса – полосы шириной 20 % от диаметра бассейна) и в целевом квадранте, а также общую протяженность поискового пути и среднюю скорость плавания.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Для построения графиков использовали Microsoft® Excel 365. Все результаты представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней. Анализ неврологических данных проводили с помощью U критерия Манна-Уитни; данные статистики приведены с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений. Данные ВТМ анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), где факторами были день обучения и воздействие, результаты пробных попыток – с помощью однофакторного ANOVA. Апостериорные сравнения средних проводили с использованием критерия Фишера наименьшей значимой разницы (LSD-тест, Фишер НЗР). Был принят уровень значимости  $p < 0.05$ .

### Результаты исследования и обсуждение

Неврологические тесты обеих шкал (Гарсии и ОТНН) выявляли значительные нарушения, вызванные фокальной ишемией (ФИМ) у крыс ( $n=18$ ) в течение всей недели наблюдений (рис. 1, а, б), что хорошо согласуется с данными литературы [22, 23]. Предварительное введение БЭКр практически полностью защищало крыс ( $n = 10$ ) от эффекта ФИМ (рис. 1). Во все дни после ФИМ эта группа не отличалась от ложнооперированного контроля (ЛО) и от собственного контрольного уровня до ФИМ; незначительное снижение/увеличение баллов по обоим шкалам (на 1–2 балла) отмечалось лишь у отдельных особей.

Крысы группы с «лечебным» введением БЭКр ( $n=9$ ) в шкале Гарсии (рис. 1, а) демонстрировали промежуточный уровень нарушений между ЛО и негативным контролем, отличаясь от негативного контроля

через 1 и 7 сут после ФИМ, а от ЛО через 1 и 3 сут после ФИМ (при  $p < 0.05 \sim 0.01$ ; U-тест). В то же время, по Шкале ОТНН (рис. 1, б) животные, получавшие лечебные инъекции БЭКр, после операции не отличались от негативного контроля, но отличались от ЛО на 1-е и 3-и сут ( $p < 0.05$ ; U-тест). Таким образом, лечебное введение БЭКр после ФИМ ослабляло выраженность неврологических нарушений и ускоряло восстановление неврологического статуса, но в меньшей степени, чем профилактическое.

Двухфакторный ANOVA выявил значимые различия между протестированными группами по ходу освоения водного теста Морриса (ВТМ) (рис. 2, а); эффект воздействия (группа) –  $F(3, 25) = 7.66, p < 0.001$ ; эффект дня обучения –  $F(5, 130) = 36.10, p < 0.0001$ , взаимодействие факторов –  $F(15, 130) = 1.51, p < 0.11$ . Дальнейший анализ показал, что животные из группы негативного контроля ( $n=8$ ) обучались значительно хуже группы ЛО ( $n=5$ ), а также групп, получавших препарат ( $p < 0.05 \sim 0.001$ ). Внутригрупповой анализ хода обучения показал, что группа ЛО быстро осваивала задачу теста: латентность поиска значимо снижалась уже на 2-е сут обучения (2-е сут отличаются от 1-х ( $p < 0.02$ ), 4-х и 5-х сут ( $p < 0.05$ ), а на 3-и сут приближалась к минимально возможному значению. У крыс негативного контроля существенное снижение латентности происходило лишь на 4-е сут и продолжалось далее вплоть до 6-х сут обучения (4-е сут отличаются от 1-х и 5–6 сут ( $p < 0.05 \sim 0.01$ )). В сравнении с ЛО контролем, крысы негативного контроля характеризовались большей латентностью поиска платформы на 2-е – 4-е сут обу-

чения (рис. 2, а). Таким образом, ФИМ значимо замедляла освоение ВТМ. Препарат оказывал выраженное положительное влияние на освоение теста после ФИМ. В сравнении с негативным контролем, крысы с «профилактическим» БЭКр ( $n=8$ ) существенно быстрее находили платформу на 2-е и 4-е сут, а крысы с «лечебным» введением БЭКр ( $n=9$ ) – на 4-е сут обучения (рис. 2, а). При этом наблюдались различия в характере кривых обучения. Крысы с «профилактическим» БЭКр первые 2 сут имели такую же низкую латентность как и ЛО, только на 4-е сут наблюдалось дальнейшее снижение (4-е–6-е отличаются от 1-х сут,  $p < 0.001$ ). В то время как животные с «лечебным» БЭКр последовательно снижали время поиска первые 4 сут обучения и далее оно значимо не менялось (отличие между сутками 1–4,  $p < 0.05 \sim 0.001$ ).

Анализ поисковых траекторий во время пробной попытки подтвердил существенное негативное влияние ФИМ на пространственное обучение и память. Животные негативного контроля демонстрировали явное нарушение запоминания места платформы. Так, в отличие от ЛО они не предпочитали целевой квадрант (находились в нем около четверти времени), демонстрировали выраженный тигмотаксис (в 2.5 раза дольше плавали на периферии бассейна) и очень редко пересекали место положения платформы (рис. 2, в-д). Таким образом, ФИМ нарушала механизмы обработки, запоминания и/или использования пространственной информации у крыс, что стимулировало компенсаторное развитие так называемых непространственных стратегий поиска (тигмотаксис – инстинктивный по-

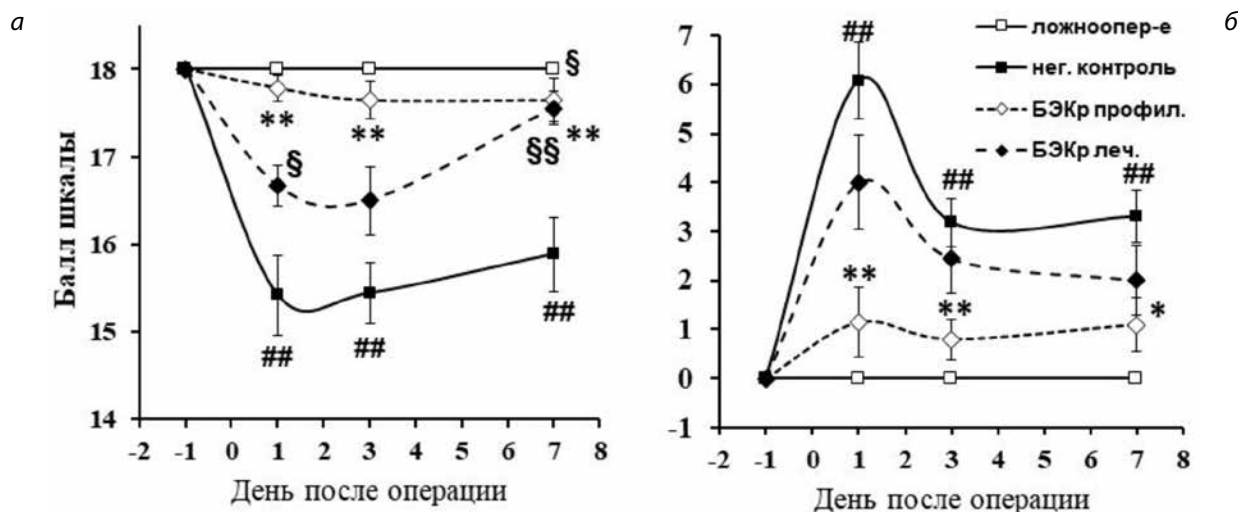


Рис. 1. Влияние бензилового эфира креатина (БЭКр) на неврологические нарушения, вызванные фокальной ишемией головного мозга (ФИМ) у крыс, выявленные шкалами Гарсии (а) и ОТНН (б).

иск спасения на периферии бассейна, ориентирование относительно стенок бассейна). Поскольку при этом общая длина пути поиска/средняя скорость плавания в обеих группах были сопоставимы (рис. 2, б), можно заключить, что неврологические нарушения у крыс с ФИМ не влияли на способность к плаванию в бассейне ВТМ, т.е. отсутствовала интерференция между неврологическими и когнитивными нарушениями. Очевидно, ФИМ негативно влияла именно на процессы пространственного обучения и памяти в водном тесте, а не на иные типы обучения (ассоциативное и пр.), что согласуется с данными литературы [27].

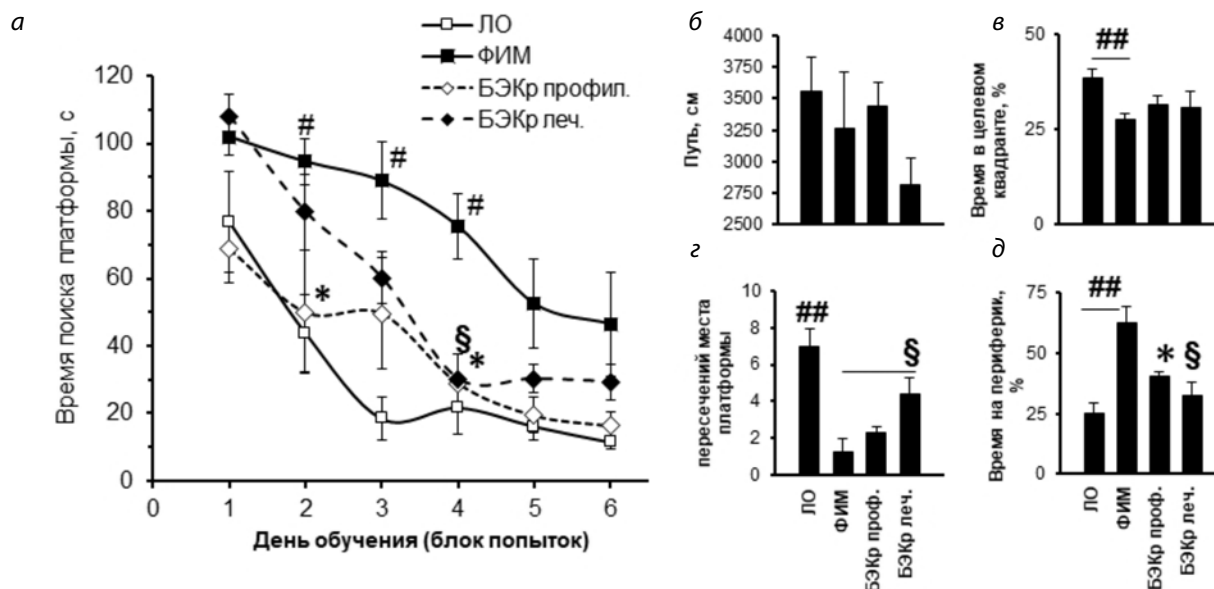
В сравнении с негативным контролем крысы с предварительным введением БЭКр имели меньшую продолжительность тигмотаксиса (рис. 2, в), а группа с лечебным введением БЭКр, демонстрировала хорошее запоминание локализации платформы и меньшую продолжительностью тигмотаксиса (рис. 2, г, д). При этом обе группы, получавшие препарат, не отличались друг от друга по показателю общего пути поиска (средней скорости плавания) и времени в целевом квадранте. Таким образом, введение БЭКр значимо облегчало освоение ВТМ после ФИМ, а также улучшало пространственную память; когнитивные процессы пространственного обучения у групп с препаратом протекали быстрее и эффективнее, чем в контрольной группе с ФИМ, при этом динамика процессов и эффективность запоминания и использования простран-

ственной информации несколько варьировала в зависимости от порядка введения.

Продемонстрированное отличие степени эффективности бензилового эфира креатина для протекции неврологических и когнитивных способностей у крыс после ФИМ при его профилактическом и лечебном введении требует особого объяснения. По всей видимости, высокая скорость развития нейронального поражения при ФИМ в значительной степени ограничивает эффективность лечебного введения исследуемого вещества, поскольку необходимый этап превращения креатина в креатинфосфат (т.е. «аккумуляция» энергии в макроэргических соединениях) неизбежно затягивается из-за нехватки или отсутствия необходимых субстратов энергетического метаболизма. Кроме того, так как активность белка–переносчика креатина зависит от градиента  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  [28], в условиях ишемии транспорт креатина в клетки может нарушаться из-за снижения мембранного градиента соответствующих ионов.

### Заключение

Впервые показано, что внутрибрюшинное введение нового синтетического производного креатина – бензилового эфира креатина – эффективно предупреждает развитие неврологических нарушений и снижает степень когнитивных нарушений вызванных экспериментальной фокальной ишемией мозга у крыс при профилактическом режиме введения, а также ослабляет



**Рис. 2.** Влияние бензилового эфира креатина (БЭКр) на обучение крыс (а) в водном тесте Морриса после фокальной ишемии головного мозга и параметры поисковой активности животных в пробную попытку (б–д).

тяжесть неврологических нарушений и снижает выраженность когнитивных нарушений при лечебном режиме введения. Результаты исследования позволяют рекомендовать данное производное креатина (после завершения оценки возможной токсичности) для проведения первой фазы клинических испытаний в качестве противоишемического препарата.

### Литература

(п.п. 1-6; 8-17; 19-28 см. References)

7. Самойлов М.О. Мозг и адаптация: молекулярно-клеточные механизмы. Санкт-Петербург: Изд-во ин-та физиологии им. И.П. Павлова РАН; 1999.
18. Муровец В.О., Ленцман М.В., Артемьева А.И., Балестрино М., Поленов С.А. Креатин эффективен для профилактики неврологических и когнитивных нарушений, вызванных глобальной ишемией головного мозга у крыс. *Нейронауки*. 2006; 1(3): 20-4.

### References

1. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(10): e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.
2. Furlan A.J. Challenges in acute ischemic stroke clinical trials. *Curr Cardiol Rep*. 2012; 14(6): 761-6. doi: 10.1007/s11886-012-0311-9.
3. Chamorro Á. Neuroprotectants in the Era of Reperfusion Therapy. *Journal of Stroke*. 2018; 20(2): 197-207.
4. Bhaskar S., Stanwe P., Cordato D., Attia J. and Levi C. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? *BMC Neurology*. 2018; 18(1): 8. doi: 10.1186/s12883-017-1007-y.
5. You S., Saxena A., Wang X., Tan W.Y., Han Q., Cao Y., Liu C.-F. Efficacy and safety of intravenous recombinant tissue plasminogen activator in mild ischaemic stroke: a meta-analysis. *Stroke and Vascular Neurology*. 2018; 3: e000106. doi:10.1136/svn-2017-000106.
6. El Amki M., Wegener S. Improving Cerebral Blood Flow after Arterial Recanalization: A Novel Therapeutic Strategy in Stroke. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(12): 2669. doi: 10.3390/ijms18122669.
7. Samoilov M.O. Brain and adaptation. Molecular and cellular mechanisms. [*Mozg i adaptatsia: molekuliarno-kletochnie mekhanizmi*]. Saint-Petersburg: Pavlov Institute of Physiology Press, 1999. (In Russian)
8. Carter A.J., Muller R.E., Pschorn U., Stransky W. Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampal slices. *J. Neurochem*. 1995; 64(6): 2691-9.
9. Balestrino M., Lensman M., Parodi M., Perasso L., Rebaudo R., Melani R., et al. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage. *Amino Acids*. 2002; 23(1-3): 221-9.
10. Horn M., Frantz S., Remkes H., Laser A., Urban B., Mettenleiter A., et al. Effects of chronic dietary creatine feeding on cardiac energy metabolism and on creatine content in heart, skeletal muscle, brain, liver and kidney. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1998; 30(2): 277-84.
11. Dechent P., Pouwels P.J.W., Wilken B., Hanefeld F., Frahm J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatinemonohydrate. *Am. J. Physiol*. 1999; 277(3): R698-704.
12. Perasso L., Cupello A., Lunardi G. L., Principato C., Gandolfo C., Balestrino M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. *Brain Res*. 2003; 974(1-2): 37-42.
13. Wick M., Fujimori H., Michaelis T., Frahm J. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. *Magn. Reson. Med*. 1999; 42(4): 798-802.
14. Zhu S., Li M., Figueroa B.E., Liu A., Stavrovskaya I.G., Pasinelli P., et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci*. 2004; 24(26): 5909-12.
15. Gualano B., Artioli G.G., Poortmans J.R. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*. 2010; 38(1): 31-44.
16. Otellin V.A., Korzhevskii D.E., Kostkin V.B., Balestrino M., Lensman M. V., Polenov S.A. The neuroprotective effect of creatine in rats with cerebral ischemia. *Doklady Biological Sciences*. 2003; 390: 197-9.
17. Lensman M., Korzhevskii D., Mourovets V., Kostkin V., Izvarina N., Perasso L. et al. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res*. 2006; 1114(1): 187-94.
18. Mourovets V.O., Lensman M.V., Artemieva A.I., Balestrino M., Polenov S.A. Creatine is effective in the prevention of neurological and the reduction of cognitive disturbances induced by global cerebral ischemia in rats. *Russ. J. Neurosci*. 2006; 1(3): 20-4. (in Russian)
19. Lunardi G., Parodi A., Perasso L., Pohvozheva A.V., Scarrone S., Adriano E. et al. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience*. 2006; 142(4): 991-97.
20. 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): 472-76.
21. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1981. 1(1): 53-60.
22. Garcia J.H., Wagner S., Liu K., Hu X. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical Validation. *Stroke*. 1995; 26(4): 627-35.
23. Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001; 32(4): 1005-11.
24. Morris R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981; 12(2): 239-60.
25. DeVries A.C., Nelson R.J., Traystman R.J., Hurn P.D. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2001; 25(4): 325-42.
26. Vorhees C.V., Williams M.T. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 2015; 52(Pt A): 93-108.
27. Roof R.L., Schielke G.P., Ren X., Hall E.D. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke*. 2001; 32(11): 2648-57.
28. Speer O., Neukomm L.J., Murphy R.M., Zanolla E., Schlattner U., Henry H., et al. Creatine transporters: a reappraisal. *Mol. Cell. Biochem*. 2004; 256-257(1-2): 407-24.

### Сведения об авторах:

**Муровец Владимир Олегович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., e-mail: mourovets@mail.ru;

**Ленцман Михаил Валерьевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., e-mail: mlensman@yandex.ru