



А.А. Ходаковский

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА 1-АДАМАНТИЛЕТИЛОКСИ-3-МОРФОЛИНО- 2-ПРОПАНОЛА ГИДРОХЛОРИДА (АДЕМОЛА) В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

*Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
кафедра фармакологии,*

Украина, 21018, г. Винница, ул. Пирогова, 56. E-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru

Цель. Охарактеризовать эффективность адемола в восстановительном периоде ишемического инсульта за нейроморфологическими изменениями в коре головного мозга крыс.

Материалы и методы. Экспериментальная терапия крыс с инфарктом головного мозга (билатеральная каротидная окклюзия) производным адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлоридом (условное название адемола) проводилась в дозе 2 мг/кг внутривентриально в лечебном режиме (через 1 час после моделирования инсульта и далее через каждые 24 ч в течение 21 суток).

Результаты. В ходе проведенных исследований было установлено, что восстановительный период модельного острого нарушения мозгового кровообращения (билатеральная каротидная окклюзия) параллельно с уменьшением площади и плотности морфологически неповрежденных нейроцитов, а также содержания в них нуклеиновых кислот сопровождается увеличением количества и плотности деструктивно-измененных нейронов. Терапевтическое курсовое введение адемола по вышеуказанной схеме способствует нормализации микроморфометрических характеристик соматосенсорной коры головного мозга, что проявляется сохранением плотности и площади структурно неповрежденных нейронов на фоне уменьшения плотности нейроглии и деструктивно-измененных нервных клеток.

Выводы. Способность адемола сохранять citoархитектонику коры головного мозга свидетельствует о наличии у него церебропротекторных свойств и обосновывает перспективу создания на его основе нового церебропротектора.

Ключевые слова: адемола, ишемический инсульт, цитиколин.

A.A. Khodakovskiy

NEUROPROTECTOR CHARACTERISTICS OF ADEMOL IN THE REGENERATIVE PERIOD OF EXPERIMENTAL ISCHEMIC INSULT

*National Pirogov Memorial Medical University, Vinnitsya,
Pharmacology Department*

56 Pirogova Street, Vinnitsya, 21018, Ukraine. E-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru

Purpose: To describe the differential features of Essential Tremor and Parkinson Disease.

Purpose. Characterized efficiency of ademol in the regenerative period of ischemic insult according neuromorphological changes in the cortex of the brain of the rats.

Materials and methods. Experimental therapy of the rats with cerebral infarction (bilateral carotid occlusion) by derivate of adamantan 1-adamantilethyloxy-3-morpholino-2 propanol hydrochloride (under conventional name ademol) was conducted in dose 2 mg/kg intraabdominal in the treatment mode (in an hour after modeling of insult and further after every 24 hours during 21 days).

Results. In the course of conducted investigations were established that in the regenerative period of the modeling acute disorder of cerebral circulation (bilateral carotid occlusion) takes place increasing of quantity and density of destructively changed neurons parallel with decreasing of area and density of morphologically undamaged neurons and also contents of nucleic acids in them. Therapeutic course injection of ademol by the scheme as outlined above contributes to the normalization of micromorphometric characteristics of somatosensory cortex of the brain, that is manifested by conservation of density and area



of structurally undamaged neurons on the background of decreasing of density of neuroglia and destructively changed nervous cells.

Summary. Ability of ademol to maintain cytoarchitectonics of the brains' cortex indicates the presence of cerebroprotective characteristics of it and justifies the perspective of development of new cerebroprotector on its base.

Key words: ademol, ischemic insult, citikoline.

Введение

Создание концепции потенциальной обратимости последствий острой церебральной ишемии позволило выделить ключевые направления в лечении инсульта, которые базируются на улучшении перфузии головного мозга, профилактике повторного тромбоза и проведении нейропротекторной терапии. На сегодняшний день патогенетически обосновано целесообразность назначения нейропротекторов в составе интенсивной терапии острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) [1, 2].

Задачи первичной нейропротекции направлены, главным образом, на прерывание быстрых реакций глутамат-кальциевого каскада. Есть основания полагать, что будущее в этом направлении принадлежит высокоселективным блокаторам NMDA-рецепторов [3, 4]. В дальнейшем, согласно основным этапам развития острой церебральной ишемии необходимо внедрять принципы вторичной нейропротекции, прежде всего, за счет препаратов, которые влияют на отсроченные механизмы нейрональной смерти (блокада провоспалительных цитокинов, молекул клеточной адгезии, торможение прооксидантных ферментов, восстановление нейротрофики, прерывание нейроапоптоза и т.д.). При этом следует отметить, что эффективность вторичной нейропротекции во многом зависит от своевременного подавления глутаматной эксайтотоксичности [5].

Одним из перспективных соединений, которое обладает такими свойствами может стать синтезированное под руководством акад. М. О. Лозинского в Институте органической химии НАН Украины производное адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлорид (лабораторный шифр ЮК-1, условное название адемола). Ранее нами был проведен фармакологический скрининг 70 соединений данного химического ряда и обнаружено, что именно адемола является лидером по антигипоксическому, противоишемическому и церебропротекторному действию [6]. Стимулом для углубленного исследования церебропротекторного действия адемола стали данные о том, что он является низкоафинным неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторов ионофорного комплекса пирамидных нейронов гиппокампа с очень быстрой блокадой/деблокадой NMDA-рецепторов [7]. Это может указывать на способность адемола обеспечивать нормальное функционирование нейронов зоны пенумбры за счет селективного снижения избыточной активации NMDA-рецепторов в условиях церебральной ишемии, что делает перспективным его использование для профилактики и лечения ишемических поражений головного мозга. Экспериментальная проверка этих предположений доказала эффективность адемола в условиях острой церебральной ишемии. В частности, лечебное введение адемола крысам с ОНМК уменьшало деструктивные изменения в нейронах головного мозга и способствовало восстановлению нарушенных показателей кислотно-щелочного равновесия [8, 9]. Поскольку при инсульте именно глутаматная эксайтотоксичность является одним из триггерных фак-

торов, влияющих на реализацию различных механизмов нейрональной смерти (некроз, апоптоз), и с учетом положительного модулирующего влияния адемола на NMDA-рецепторы было целесообразным оценить наличие и выраженность его нейроцитопротекторных свойств в более поздний период ОНМК.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Охарактеризовать эффективность адемола в восстановительном периоде ишемического инсульта за нейроморфологическими изменениями в коре головного мозга крыс.

Материалы и методы

Влияние адемола на морфологические изменения в сомато-сенсорной коре головного мозга в условиях экспериментальной церебральной ишемии изучали на модели необратимой билатеральной каротидной окклюзии (БКО) у крыс, которую выполняли под пропофоловым наркозом (60 мг/кг внутривенно (в/в), «Fresenius Kabi», Австрия). Выбранная модель позволяет воспроизвести клиническую картину ишемического инсульта [10]. Гистологическая оценка микроморфометрической картины исследуемой области головного мозга была проведена у 40 нелинейных крыс-самцов, которые были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой, в соответствии с проводимой терапией ОНМК. Первая группа животных - ложно-оперированные крысы, которым для нивелирования влияния пропофола и хирургического вмешательства выполняли все процедуры, кроме перевязки сонных артерий. Вторая (контрольная) - крысы с ОНМК, которым вводили только 0,9 % NaCl (0,5 мл/кг в/в). Третья и четвертая - животные с церебральной ишемией, которым проводили лечение соответственно адемолом (в условно эффективной дозе 2 мг/кг в/в) и цитиколином в дозе 250 мг/кг в/в («Ferrer Snternational, S. A.», Испания). Экспериментальную терапию модельного инсульта начинали через 1 ч после БКО, а далее один раз в день в течение 21 суток.

После завершения опыта (21 сутки после моделирования ОНМК) животных выводили из эксперимента путем передозировки тиопентала натрия. Для гистологических исследований мозг помещали на 24 ч в фиксатор Карнуа и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. На ротационной микромете изготовляли 5-микронные срезы соматосенсорной коры (слой IV-V), которые окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления нуклеиновых кислот (НК). Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Морфометрический анализ клеток мозга проводили в автоматическом режиме с помощью макро-программы, разработанной в специализированной среде программирования VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Германия).

Определяли следующие показатели: площадь нейронов (мкм^2) их плотность (количество клеток на 1 мм^2 площади



среза коры мозга) содержание в них НК, которое измеряли в единицах оптической плотности (ЕОП) и рассчитывали как логарифм соотношения оптической плотности тела клетки к оптической плотности межклеточного вещества. Также высчитывали плотность деструктивно-измененных нейронов (количество клеток на 1 мм² площади среза коры мозга). Деструктивно-измененными считались те нейроны, которые имели признаки кариопикноза, кариорексиса или цитолиза. Выжившими - только те нейроны, которые в плоскости среза содержали ядрышко. Отдельно проводилась оценка индекса относительной активности микроглии и индекса улучшения выживаемости нейронов. Первый равнялся модулю частного от деления разности в плотности выживших нейронов на разность в плотности деструктивно-измененных нейроцитов (разность между показателями группы соответствующего исследуемого вещества и контроля). Второй определялся отношением плотности выживших нейронов на фоне терапии адемолом или цитиколином к плотности нейроцитов в контрольной группе [10].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistika 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

Все эксперименты проводили с разрешения этического комитета Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова, который на основании решения Ученого совета ВУЗа относительно гуманности и этичности проведения запланированных исследований на данную тематику (протокол № 1 от 29.09.2011) постановил (протокол № 2 от 31.01.2013), что материалы представленной научной работы не противоречат приказу Министерства Здравоохранения Украины № 281 от 01.11.2000 «О гуманном обращении с животными».

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований было установлено, что модельное ОНМК приводило к достоверному снижению плотности нейронов в коре головного мозга крыс на 21 сутки эксперимента в среднем соответственно на 32,41% (табл. 1; рис. 1 и 2).

Таблица 1

Изменения микроморфометрических показателей соматосенсорной коры головного мозга крыс на 21 сутки острой церебральной ишемии (слой IV-V) при лечебном внутрибрюшинном введении адемола (2 мг/кг) и цитиколина (250 мг/кг) ($M \pm m$, $n = 10$)

Показатели	Плотность нейронов (на 1 мм ²)	Площадь нейронов (мкм ²)	Содержание нуклеиновых кислот (ЕОП)	Плотность деструктивно-измененных нейронов (на 1 мм ²)
Ложно-оперированные животные	1482,20±12,30	75,13±0,45	9,80±0,15	84,40±1,86
ОНМК+ 0,9 % NaCl (контроль)	1001,90±13,83* (-32,41 %)	67,44±0,57* (-10,24 %)	5,85±0,11* (-40,31 %)	389,50±4,38* (+361,49 %)
ОНМК + адемола	1284,90±5,47*# (-13,32 %) [+28,25 %]	70,56±0,38*# (-6,09 %) [+4,62 %]	7,30±0,08* (-25,52 %) [+24,79 %]	293,60±6,14* (+247,87 %) [-24,62 %]
ОНМК + цитиколин	1273,00±10,44*# (-14,12 %) [+27,05 %]	70,94±0,33*# (-5,58 %) [+5,19 %]	7,58±0,11* (-22,66 %) [+29,57 %]	284,60±4,13* (+237,20 %) [-26,93 %]

Примечания:

1. НК - нуклеиновые кислоты. 2. Статистически значимые различия ($p < 0,05$):* - с показателем ложно-оперированных животных, # - с контрольной патологией, ^ - с эффектом цитиколина. 3. В скобках - изменение (%) относительно показателя ложно-оперированных животных, в квадратных скобках - относительно показателя контрольной группы.

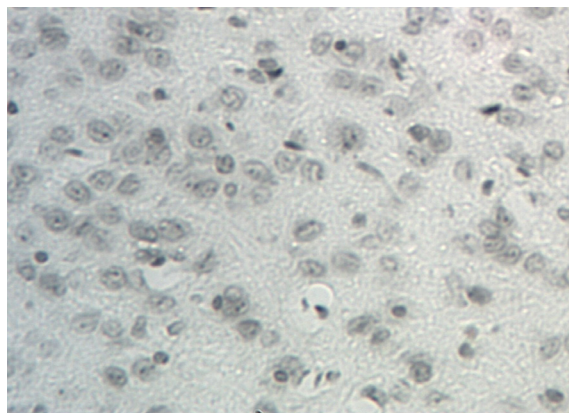


Рис. 1. Соматосенсорная кора ложно-оперированной крысы. Отсутствие признаков нейрональной деструкции (нейронов с явлениями кариопикноза, кариорексиса и цитолиза). Все нейроциты в плоскости среза содержат ядрышко. × 400 окраска по Ейнарсону.

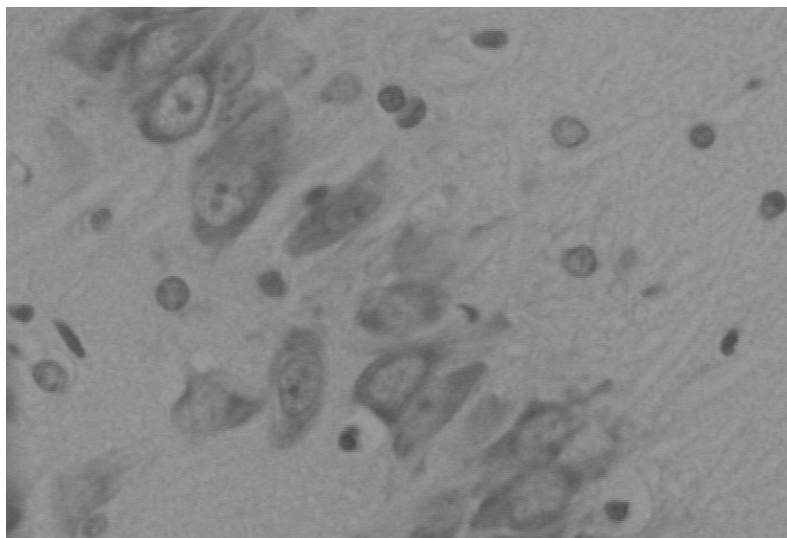


Рис. 2. Соматосенсорная кора крысы на 21 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии (контрольная патология). Уменьшение плотности сохранившихся и увеличение деструктивно-измененных нейронов (появление нейронов с явлениями кариопикноза, кариорексиса и цитолиза) $\times 600$, окраска по Ейнарсону.

Введение крысам с ОНМК адемола, так же как и цитиколина, на 21 сутки после моделирования церебральной ишемии препятствовало снижению исследуемого показателя. Причем по своей эффективности адемола не уступал референс-препарату - плотность нейронов соматосенсорной области коры ишемизированного головного мозга была достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем в контроле в среднем соответственно на 28,25% и 27,05% (табл. 1; рис. 3 и 4). Вместе с тем, церебральная ишемия в восстановительный период сопровождалась достоверным уменьшением относительно ложно-оперированных животных площади тел нейронов в среднем на

10,24%, а также содержанием в них НК на 40,31% (табл. 1; рис. 1 и 2). Подобные изменения отражали характер ишемического повреждения нейронов, что выражалось в истощении структурных и пластических компонентов нейронов. В восстановительный период ОНМК у животных на фоне курсовой терапии адемолом и цитиколином удалось достичь достоверного относительно контроля увеличения площади тел нейронов, что сопровождалось увеличением содержания в них НК в среднем на 24,79 и 29,57% ($p < 0,05$). При этом, оба вещества по своей эффективности сопоставлялись (табл. 1; рис. 3 и 4).

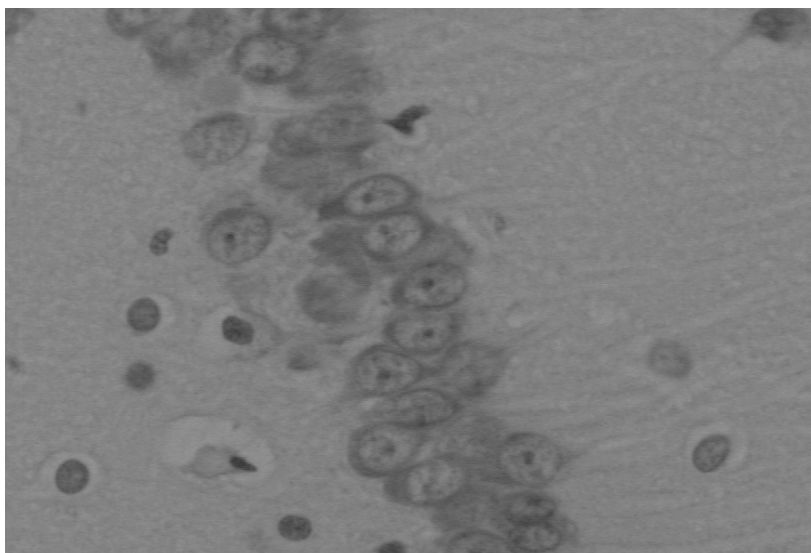


Рис. 3. Соматосенсорная кора крысы на 21 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии на фоне курсовой терапии адемолом (2 мг/кг в/б). Сохранение площади и плотности нейронов, угнетение процессов нейрональной деструкции. Уменьшение количества нейронов с явлениями кариопикноза, кариорексиса и цитолиза. Увеличение количества нейронов, содержащих в плоскости среза ядрышко. $\times 600$, окраска по Ейнарсону.

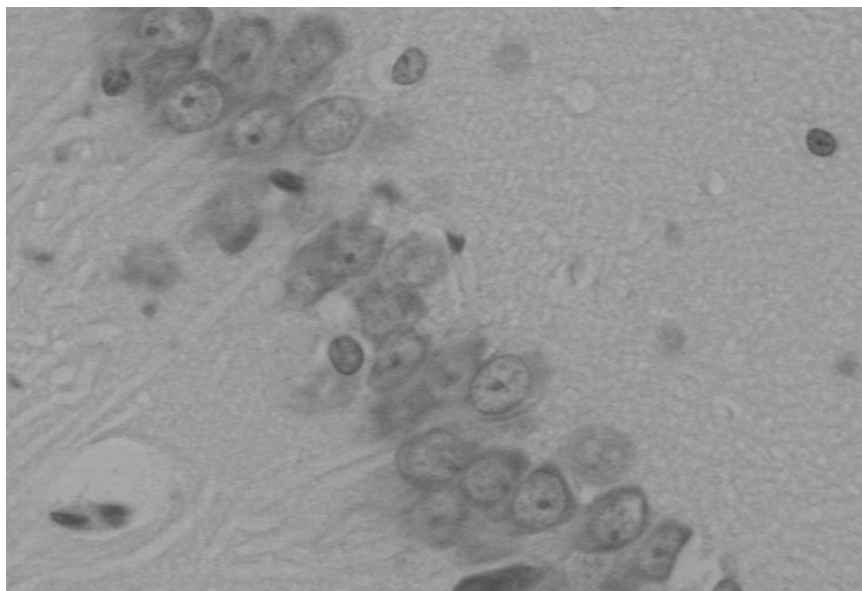


Рис. 4. Соматосенсорная кора крысы на 21 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии на фоне курсовой терапии цитиколином (250 мг/кг в/б). Сохранение плотности нейронов, угнетение процессов нейрональной деструкции. Уменьшение количества нейронов с явлениями кариопикноза, кариорексиса и цитолиза. Увеличение количества нейронов, содержащих в плоскости среза ядрышко. $\times 600$, окраска по Ейнарсону.

Анализ плотности деструктивно-измененных нейронов в коре ишемизированного головного мозга у животных с ОНМК, которым проводилась только терапия физиологическим раствором NaCl показал, что количество поврежденных нейронов на 21 сутки после моделирования патологии по сравнению с ложно-оперированными животными достоверно увеличилось в 4,6 раза (табл. 1; рис. 1 и 2). В противовес этому, введение крысам с ОНМК производного адамантана подобно цитиколину тормозило увеличение этого показателя. К окончанию эксперимента количество деструктивно-измененных нейронов на фоне адемола и референс-препарата было соответственно на 24,62% и 26,93% меньше ($p < 0,05$), чем в группе контрольных животных (табл. 1; рис. 3 и 4).

Интегральным показателем эффективности исследуемых веществ в условиях острой церебральной ишемии может служить индекс улучшения выживаемости нейронов и индекс относительной активности микроглии. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, лечебное курсовое введение крысам с ОНМК адемола (как и цитиколина) приводило к уменьшению процессов нейрональной гибели (в обоих случаях индекс улучшения выживаемости нейронов был больше 1).

Таблица 2.

Показатели нейропротективного действия адемола (2 мг/кг) и цитиколина (250 мг/кг) на 21 сутки модельной церебральной ишемии

Показатели Условия опыта	Индекс улучшения выживания нейронов	Индекс относительной активности микроглии
ОНМК + адемола	1,28	2,95
ОНМК + цитиколин	1,27	2,58

При этом, по величине защитного влияния на нейроны соматосенсорной коры в восстановительном периоде адемола не уступал референс-препарату. Индекс улучшения выживаемости нейронов на фоне исследуемого адамантана и цитиколина составил соответственно 1,28 и 1,27.

Терапия крыс с острой церебральной ишемией адемолом и в меньшей степени цитиколином стимулировала активность микроглиальных клеток, что существенно повышало скорость элиминации отмерших нейронов. В пользу такого утверждения свидетельствовало повышение индекса относительной активности микроглии больше 1. Так, на 21 сутки он составил соответственно 2,95 и 2,58 (табл. 2).

Заключение

Таким образом, БКО сопровождается активацией деструктивно-дегенеративных процессов в соматосенсорной коре головного мозга крыс. Оригинальное производное адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанол гидрохлорид (адемола) способствует сохранению плотности и площади нейронов на фоне уменьшения аналогичных показателей деструктивно-измененных нервных клеток. Полученные данные о состоянии исследуемых микроморфометрических показателей при лечебном введении исследуемого производного адамантана позволяют отнести его как к первичным, так и к вторичным нейропротекторам. При этом следует отметить, что его эффективность в восстановительном периоде во многом обусловлено его способностью перерывать быстрые реакций глутамат-кальциевого каскада за счет высокоселективной блокады NMDA-рецепторов.

Поскольку размер очага инфаркта и возможность дальнейшего восстановления утраченных функций прямо



зависит от количества нейронов, погибших в результате ишемии, способность адемола способствовать сохранению структурной и функциональной целостности клеток головного мозга лежит в основе механизма его мембрано-протекторного эффекта. Результаты настоящего исследования указывают на перспективность создания на основе 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлорида нового церебропротектора.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает глубокую благодарность за помощь в проведении исследований к. биол.н., старшему преподавателю кафедры фармакологии Запорожского государственного медицинского университета **Павлову С.В.** и к. мед. н., доценту кафедры фармакологии Запорожского государственного медицинского университета **Бухтияровой Н.В.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев [др.] — Донецк: Издатель Заславский А.Ю., — 2009. - 262 с.
2. Яворская В. А. Цитиколин при остром инсульте: механизм действия, безопасность и эффективность (научный обзор) / В. А. Яворская, Ю. В. Фломин, А. В. Гребенюк // Международный неврологический журнал. — 2011. - № 2 (40). — С. 74-80.
3. Grabb M. C. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors / M. C. Grabb, D. W. Choi // J. Neurosci. - 2009. - Vol. 19. — Н.1657-1662.
4. Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists D-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia / A. Sabine Fuchs [et al.] // Amino Acids. — 2012. - Vol. 43. - P. 355-363.
5. Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the up-regulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells / W. Neuhaus [et al.] // Neuroscience Letters. — 2012. - Vol. 506. — P. 44-49.
6. Ходаковский А. А. Скрининг церебропротекторного эффекта среди новых производных адамантана в условиях экспериментальной ишемии головного мозга / А. А. Ходаковский, Г. И. Степанюк, Ю. В. Короткий // Фармакология и лекарственная токсикология. — 2010. - № 3 (16). — С. 8-11.
7. Ходаковский А. А. Сравнительная оценка влияния производных адамантана соединений ЮК-1 и ЮК-4 на активность NMDA-рецепторов // Клиническая фармация. — 2011. — Т. 15, № 4. — С. 60-63.
8. Ходаковский А. А. Влияние курсовой экспериментальной терапии адемолом (соединение ЮК-1) на динамику показателей кислотно-щелочного равновесия в ишемизированном головном мозге / А. А. Ходаковский // Вестник морфологии. — 2010. — Т. 16, № 4. — С. 787-790.
9. Ходаковский А. А. Оценка влияния экспериментальной терапии адемолом на интенсивность деструктивных изменений в мембранах нейронов у монгольских песчанок при острой церебральной ишемии / А. А. Ходаковский // Вестник морфологии. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 62-65.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. — [2-е изд., перераб. и доп.]. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — 832 с.
11. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. Рекомендации / И. С. Чекман [и др.]. — Киев, 2010. — 81 с.

ПОСТУПИЛА: 13.02.2013