

## НЕЙРОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АДЕМОЛА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ МОДЕЛЬНОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

© *Ходаковский А.А.*

**Кафедра фармакологии**

**Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Винница, Украина**

E-mail: [aleksey.hodakovskiy@bk.ru](mailto:aleksey.hodakovskiy@bk.ru)

В опытах на крысах установлено, что в остром периоде модельного острого нарушения мозгового кровообращения (билатеральная каротидная окклюзия) параллельно с уменьшением площади и плотности морфологически неповрежденных нейроцитов, а также содержания в них нуклеиновых кислот происходит увеличение количества и плотности деструктивно-измененных нейронов. Экспериментальная терапия крыс с инфарктом головного мозга производным адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлоридом (условное название адемола) в дозе 2 мг/кг внутривентрикулярно в лечебном режиме (через 1 час после моделирования инсульта и далее через каждые 24 ч в течение 4 суток) способствует нормализации микроморфометрических характеристик сомато-сенсорной коры головного мозга, что проявляется сохранением плотности и площади структурно неповрежденных нейронов на фоне уменьшения плотности нейроглии и деструктивно-измененных нервных клеток. Способность адемола сохранять цитоархитектонику 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.

## NEUROMORPHOLOGICAL EVALUATION OF ADEMOL EFFICIENCY IN ACUTE PERIOD OF SIMULATED DISORDER OF CEREBRAL CIRCULATION

*Khodakovskiy A.A.*

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

The experiments on the rats have established that in the acute period of simulated acute disorder of cerebral circulation (bilateral carotid occlusion) the increase in quantity and density of destructively changed neurons occurs simultaneously with the decrease in the area and density of morphologically undamaged neurons as well as the contents of nucleic acids in them. The experimental therapy of rats with cerebral infarction with derivatives of adamantan 1-adamantylethyloxy-3-morpholino-2 propanol hydrochloride (an identification name - Ademol) in dose of 2 mg/kg intra-abdominally according to the therapy scheme (an hour later after modeling stroke and then every 24 hours within 4 days) contributes to the normalization of micromorphometric characteristics of somatosensory brain cortex. It expresses itself in the preservation of density and area of structurally undamaged neurons against a background of decreasing neuroglia density and destructively changed nervous cells. The ability of Ademol to maintain cytoarchitecture of the brain cortex indicates the presence of its cerebroprotective characteristics and justifies the perspective of developing a new cerebroprotector.

**Keywords:** Ademol, ischemic stroke, citicoline.

Современные данные об особенностях патогенеза ишемического повреждения головного мозга основаны на учении о существовании ишемической полутени (пенумбры) и развитии глутаматной эксайтотоксичности, что предусматривает внедрение мер первичной и вторичной церебропротекции [1; 9]. 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 [10-12]. Одним из таких перспективных соединений 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 [7]. 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 [6]. 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 предпо-

ложений доказала эффективность адемола в условиях острой церебральной ишемии. В частности, лечебное введение адемола крысам с острым нарушением мозгового кровотока (ОНМК) уменьшало деструктивные изменения в нейронах головного мозга и способствовало восстановлению нарушенных показателей кислотно-щелочного равновесия [4; 5]. Поскольку при инсульте именно глутаматная эксайтотоксичность является одним из триггерных факторов, влияющих на реализацию различных механизмов нейрональной смерти (некроз, апоптоз), и с учетом положительного модулирующего влияния адемола на NMDA-рецепторы было целесообразным оценить выраженность его нейроцитопротекторных свойств.

Цель исследования - охарактеризовать корректирующее влияние адемола на динамику микроморфометрических изменений в коре головного мозга как одно из проявлений его нейропротекторного действия.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 [3]. Для нивелирования влияния пропофола и хирургического вмешательства вместо интактных животных использовали ложнопереоперированных крыс, которым выполняли все процедуры, кроме перевязки сонных артерий. Экспериментальную терапию острой церебральной ишемии адемолом в максимально эффективной дозе 2 мг/кг (в/в) начинали через 1 ч после БКО, а далее один раз в день в течение 4 суток. Референс-препарат цитиколин («Ferrer Snternational, S. A.», Испания) (250 мг/кг) вводили в лечебном режиме по аналогичной схеме.

После завершения опыта (4 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 микротоме изготавливали 5-микронные срезы сомато-сенсорной коры (слой IV-V), которые окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону (при pH 0,8-1,75) для специфического выявления нуклеино-

вых кислот (НК) [2]. Для каждого образца готовили 10 срезов. Изображение коры мозга получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры SOHU-4922 (SOHU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия), каждый срез сканировали 20 раз. 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 ( $\mu\text{м}^2$ ), их плотность (количество клеток на  $1 \text{ мм}^2$  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  $1 \text{ мм}^2$  площади среза коры мозга). Деструктивно-измененными считались те нейроны, которые имели признаки кариопикноза, кариорексиса или цитолиза. Неповрежденными считались те нейроны, которые в плоскости среза содержали ядрышко без признаков деструкции (кариопикноза, кариорексиса и цитолиза). 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 [8].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistika 6.0. Использовали параметрический критерий t Стьюдента в случае нормального распределения данных, непараметрический критерий W Уайта – при его отсутствии. Отличия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований было установлено, что модельное ОНМК на 4 сутки наблюдения приводило к достоверному снижению плотности нейронов в коре головного мозга крыс в среднем на 38,98% (табл. 1, рис. 1 и 2).

Введение крысам с ОНМК адемола,

Таблица 1

Изменения микроморфометрических показателей соматосенсорной коры головного мозга крыс на 4 сутки острой церебральной ишемии (слой IV-V) при лечебном внутривенном введении адемола (2 мг/кг) и цитиколина (250 мг/кг) ( $M \pm m, n = 10$ )

Показатели	Плотность нейронов (на 1 мм <sup>2</sup> )	Площадь нейронов (мкм <sup>2</sup> )	Содержание нуклеиновых кислот (ЕОП)	Плотность деструктивно-измененных нейронов (на 1 мм <sup>2</sup> )
Ложно-оперированные животные	1482,20±12,297	75,13±0,495	9,80±0,146	84,40± 1,857
ОНМК+ 0,9% NaCl (контроль)	904,50±11,123* (-38,98 %)	62,85±1,799* (-16,35 %)	4,92±0,140* (-49,80 %)	402,50±12,680* (+376,90 %)
ОНМК+ адемола	1141,30±20,658* <sup>#^</sup> (-23,00 %) [+26,18 %]	70,00±0,451* <sup>#^</sup> (-6,83 %) [+13,76 %]	5,80±0,105* <sup>#^</sup> (-40,82 %) [+17,88 %]	317,30±11,251* <sup>#^</sup> (+275,95 %) [-21,17 %]
ОНМК+ цитиколин	1000,10±10,882* <sup>#</sup> (-32,53 %) [+10,57 %]	66,91±0,702* (-10,95 %) [+6,46 %]	5,14±0,064* (-47,56 %) [+4,47 %]	356,90±3,539* <sup>#</sup> (+322,86 %) [-11,33 %]

Примечание: 1. НК - нуклеиновые кислоты. 2. Статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ): \* - 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.

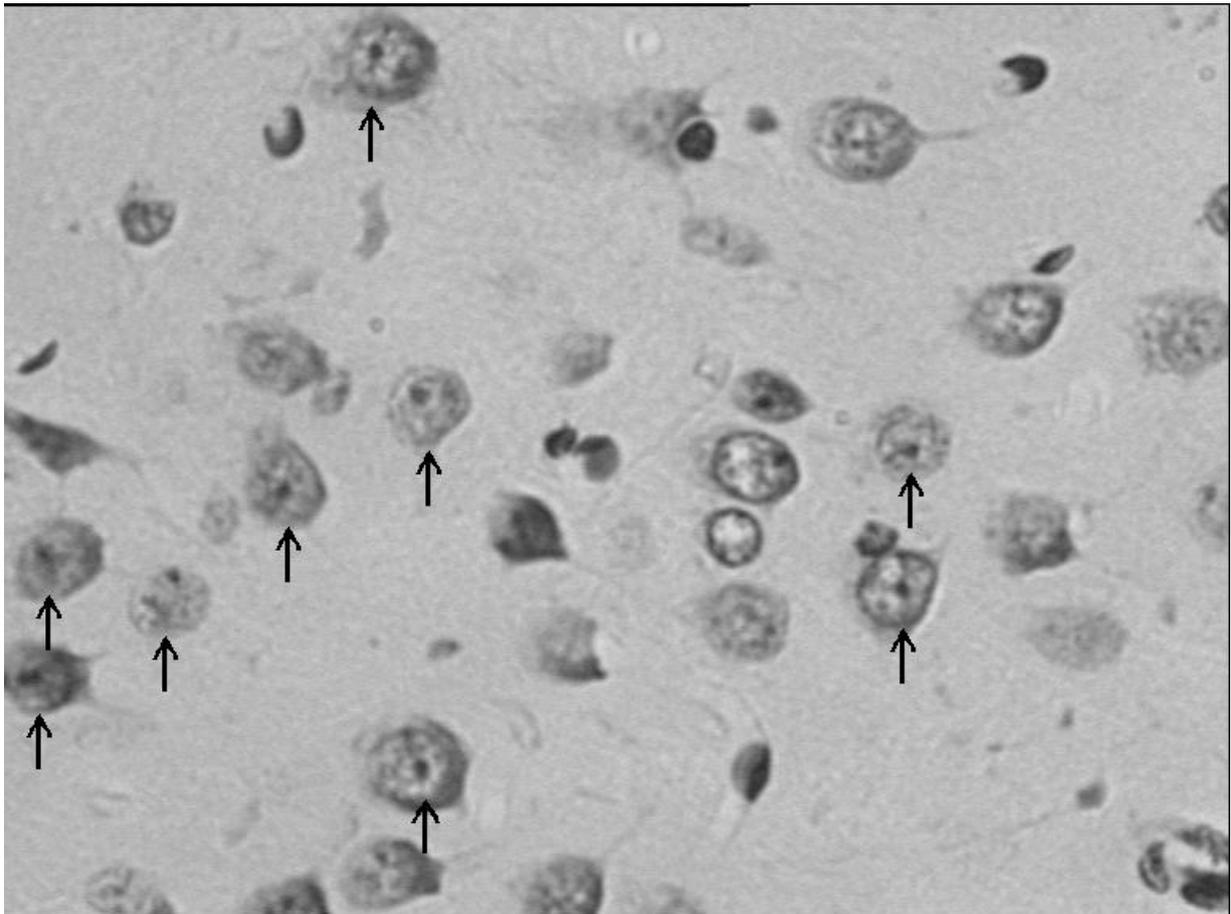


Рис. 1. Соматосенсорная кора ложно-оперированной крысы. Отсутствие явных признаков нейрональной деструкции (нейронов с явлениями кариопикноза, кариорексиса и цитоллиза). Большинство нейроцитов в плоскости среза содержат ядрышко (↑). × 400 окраска по Ейнарсону.

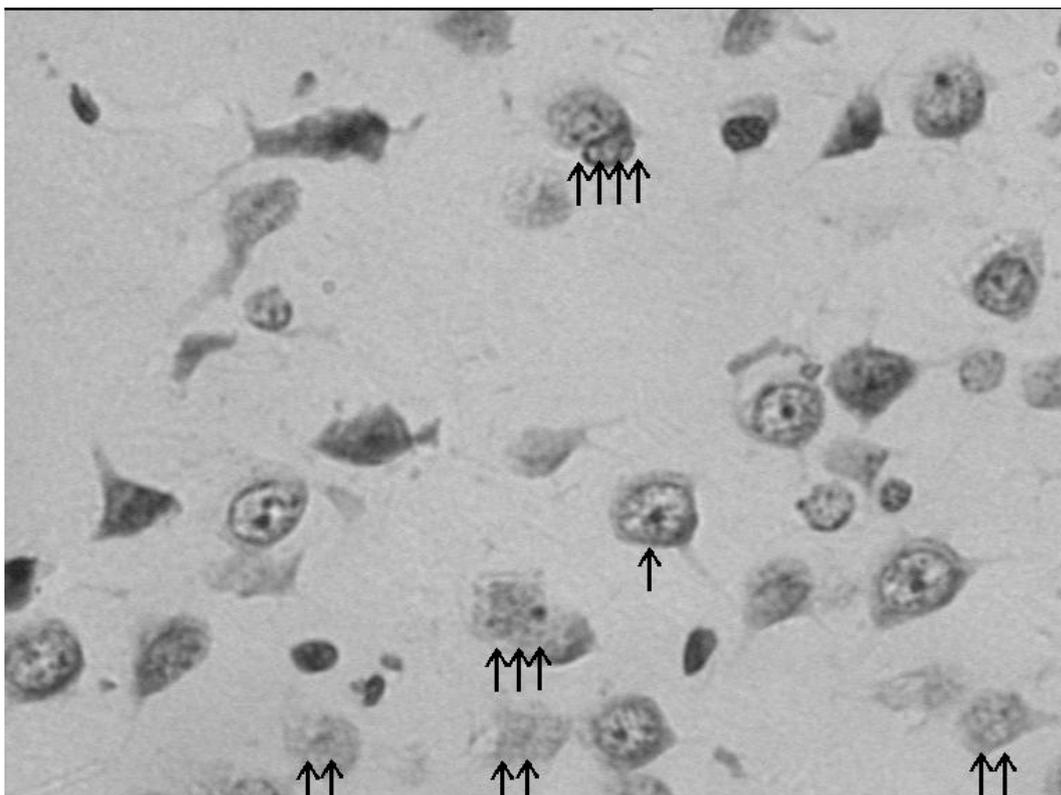


Рис. 2. Соматосенсорная кора крысы на 4 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии (контрольная патология). Уменьшение плотности неповрежденных (↑) и увеличение количества деструктивно-измененных нейронов (появление нейроцитов с явлениями цитолиза (↑↑), кариорексиса (↑↑↑) и кариопикноза (↑↑↑↑)). Ув.×600 × 600, окраска по Ейнарсону.

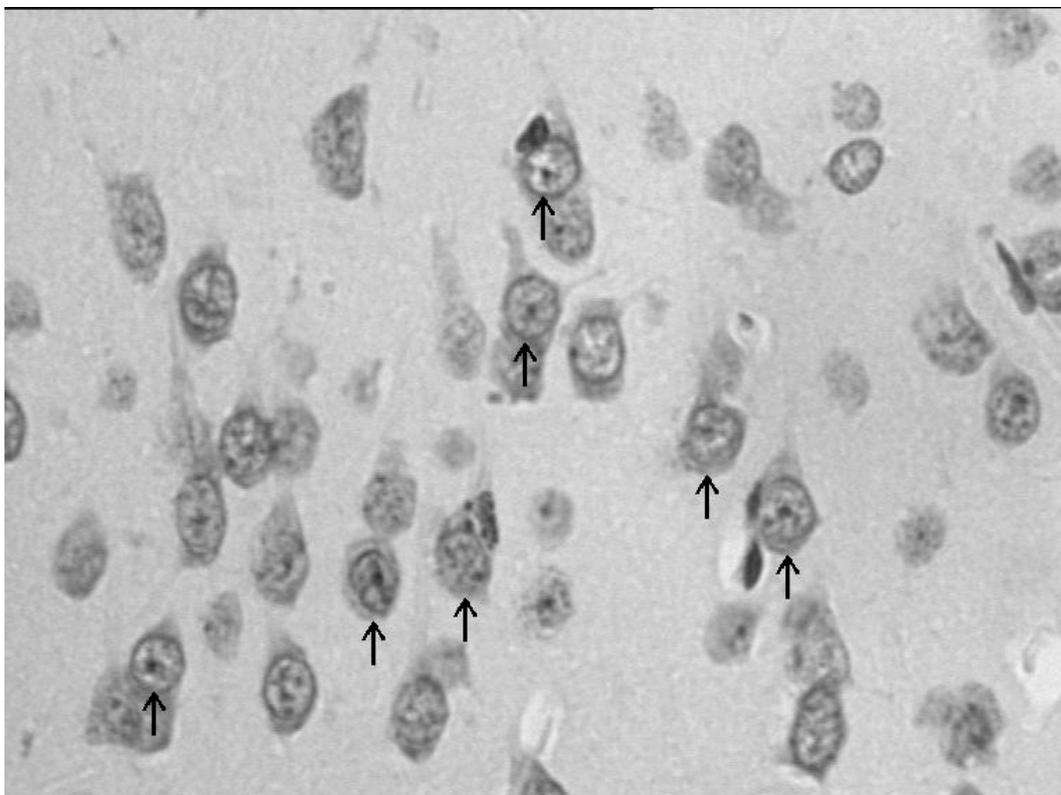


Рис. 3. Соматосенсорная кора крысы на 4 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии на фоне курсовой терапии адемолом (2 мг/кг в/б). Увеличение плотности неповрежденных нейронов (↑), которые в плоскости среза содержат ядрышко. Уменьшение количества деструктивно-измененных нейронов. Ув.×600, окраска по Ейнарсону.

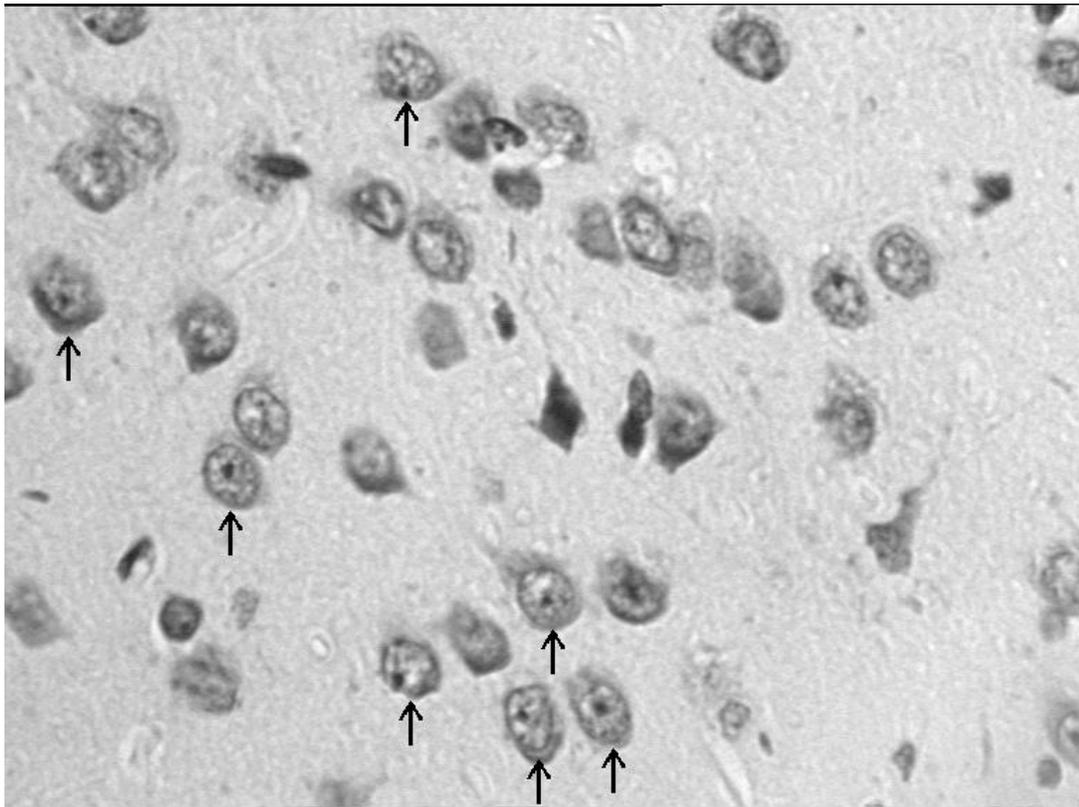


Рис. 4. Соматосенсорная кора крысы на 4 сутки после необратимой билатеральной каротидной окклюзии на фоне курсовой терапии цитиколином (250 мг/кг в/б). Увеличение плотности неповрежденных нейронов (↑), которые в плоскости среза содержат ядрышко. Уменьшение количества деструктивно-измененных нейронов. Ув.×600, окраска по Ейнарсону.

так же как и цитиколина, препятствовало снижению исследуемого показателя. Так, на 4 сутки после моделирования церебральной ишемии плотность нейронов в этих группах была в среднем соответственно на 26,18% и 10,57% выше, чем у контрольных животных, причем по своей эффективности адемола достоверно превышал цитиколин в 1,14 раза (см. табл. 1, рис. 3 и 4).

Вместе с тем церебральная ишемия в острый период сопровождалась достоверным уменьшением относительно ложно-оперированных животных площади тел нейронов в среднем соответственно на 16,35%, а также содержанием в них НК на 49,80% (табл. 1, рис. 1 и 2). Подобные изменения отражали характер ишемического повреждения нейронов, что выражалось в истощении структурных и пластических компонентов нейронов.

Лечебное введение адемола лучше, чем референс-препарат противодействовало уменьшению площади тел нейронов и содержания в них НК. Так, исследуемые показатели были достоверно выше по сравнению с контрольными животными в среднем соответственно на 13,76% и 17,88 %, а с группой крыс, получавших цитиколин, соответственно на 7,3% и 13,4% (см. табл. 2).

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 4 сутки после моделирования патологии по сравнению с ложно-оперированными животными достоверно увеличилось в 4,8 раза (табл. 1, рис. 1 и 2). В противовес этому введение адемола крысам с ОНМК тормозило рост количества деструктивно измененных нейронов - их количество было в среднем на 21,17% меньше, чем у нелеченных крыс и на 11,1% ниже, чем у животных, которые получали цитиколин ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 1, рис. 3).

Интегральным показателем эффективности исследуемых веществ могут служить такие показатели нейропротективного действия исследуемых веществ, как 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).

При этом по величине защитного влияния на нейроны соматосенсорной коры как в раннем, так и в восстановительном периоде, адемола превосходил референс-препарат. Индекс улучшения вы-

Таблица 2

Показатели нейропротективного действия адемола (2 мг/кг) и цитиколина (250 мг/кг) на 4 сутки модельной церебральной ишемии

Условия опыта \ Показатели	Индекс улучшения выживания нейронов	Индекс относительной активности микроглии
ОНМК + адемола	1,26	2,78
ОНМК + цитиколин	1,11	2,09

живаемости нейронов на 4-е сутки на фоне исследуемого адамантана составил 1,26 против 1,11.

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 4-е сутки он составил соответственно 1,28 и 1,27 (табл. 2).

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 динамике исследуемых микроморфометрических показателей при лечебном введении исследуемого производного адамантана позволяют отнести его к первичным нейропротекторам. 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 мембранопротекторного эффекта. Результаты настоящего исследования указывают на перспективность создания на основе 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлорида нового церебропротектора.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Беленичев И.Ф., Черный В.И., Колесник Ю.М. и др. Рациональная нейропротекция. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю. – 2009. – 262 с.
2. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 962 с.
3. 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.
4. Ходаковский А.А. Влияние курсовой экспериментальной терапии адемолом (соединение ЮК-1) на динамику показателей кислотно-щелочного равновесия в ишемизированном головном мозге // Вестник морфологии. – 2010. – Т. 16, № 4. – С. 787-790.
5. Ходаковский А.А. Оценка влияния экспериментальной терапии адемолом на интенсивность деструктивных изменений в мембранах нейронов у монгольских песчанок при острой церебральной ишемии // Вестник морфологии. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 62-65.
6. 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.
7. Ходаковский А.А., Степанюк Г.И., Короткий Ю.В. и др. Скрининг церебропротекторного эффекта среди новых производных адамантана в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Фармакология и лекарственная токсикология. – 2010. – № 3 (16). – С. 8-11.
8. Чекман И.С., Губский Ю.И., Беленичев И.Ф. и др. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов. Метод. рекомендации. – Киев, 2010. – 81 с.
9. Яворская В.А., Фломин Ю.В., Гребенюк А.В. Цитиколин при остром инсульте: механизм действия, безопасность и эффективность (научный обзор) // Международный неврологический журнал. – 2011. – № 2 (40). – С. 74-80.
10. Grabb M.C., Choi D.W. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 19. – P. 1657-1662.
11. Neuhaus W., Burek M., Djuzenova C.S. et al. 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 // Neuroscience Letters. – 2012. – Vol. 506. – P. 44-49.
12. Sabine Fuchs A., Cacha Peeters-Scholte M.P.C.D. Barse M.J. et al. Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists D-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia // Amino Acids. – 2012. – Vol. 43. – P. 355-363.