

*О. А. Ходаківський, канд. мед. наук, доцент каф. фармакології ВНМУ,
І. Л. Черешнюк, канд. мед. наук
Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова
(м. Вінниця)*

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОХІДНОГО АДАМАНТАНУ АДЕМОЛУ НА ФРАГМЕНТАЦІЮ ДНК ЯДЕР НЕЙРОНІВ ЛОБНИХ ЧАСТОК КОРИ ЗА ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У ЩУРІВ

У досліджах на щурах з модельним гострим порушенням мозкового кровообігу (20-хвилинна білатеральна каротидна оклюзія з наступною реперфузією) встановлено, що введення похідного адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол (умовна назва адемола) в дозі 2 мг/кг внутрішньоочеревинно в лікувальному режимі (через 1 год після ішемії та далі один раз на добу через кожні 24 год упродовж трьох діб) ліпше за цитиколін зменшує фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток головного мозку щурів (маркера нейроапоптозу). Наявність у адемола позитивної моделювальної дії на процеси нейроапоптозу може лежати в основі його церебропротекторної дії. Адемола можна вважати перспективним церебропротектором.

Ключові слова: нейроапоптоз, адемола, цитиколін

З'ясування питання про те, який вид клітинної смерті переважає у ході розвитку гострої церебральної ішемії, має важливе практичне значення для розроблення нових методів патогенетичної терапії інсульту, оскільки регенераторний потенціал нейронів різко обмежений і втрата навіть частини клітин може закінчитись фатально [2, 10, 11]. Внесок некротичної та апоптотичної смерті нейронів у загальну масу ушкодженої нервової тканини є досить варіабельним і залежить від багатьох умов. Враховуючи складність методик та швидку елімінацію апоптотичних клітин, оцінка їх сумарної частки в ішемізованій ділянці головного мозку є непростим завданням [5]. Дискутабельним залишається й питання, який вид загибелі клітин є найбільш сприятливим для головного мозку з точки зору функціональних наслідків: апоптоз чи некроз. Останній являє собою лавиноподібний, хаотичний процес деструкції клітин, що супроводжується запаленням. Руйнування десмосом та збільшення простору щілин між окремими нейронами дозволяє вільним радикалам та вторинним месенджерам вільно розповсюджуватись та вражати неушкоджені клітини, сприяючи збільшенню вогнища ураження [4, 12]. Загибель клітини шляхом апоптозу не супроводжується розвитком запалення, оскільки цілісність мембрани не порушується. Клітина втрачає більшу частину цитоплазми з подальшим утворенням апоптотичних тілець, котрі в подальшому фагоцитуються. Саме тому апоптотична загибель нейронів вважається «меншим злом» для головного мозку, хоча загальна кількість клітин зменшується [6, 13].

Але, на думку деяких дослідників, в умовах гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) апоптотична загибель клітин превалює над некротичною і явище апоптозу є виключно негативним,

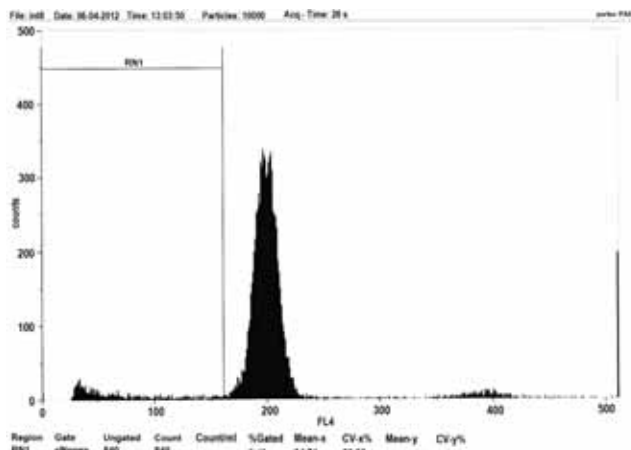
оскільки останній може індукувати всі чинники, які мають місце при вторинному ушкодженні нейронів. Тому основним напрямком цитопротекції можна вважати розроблення та клінічне застосування препаратів, які здатні попереджати та гальмувати саме явища апоптозу [7]. Попередження цього різновиду клітинної смерті традиційно розглядається позитивно, і його вибіркоче попередження може мати важливе значення для реалізації механізмів нейропротекції [8]. Проте доведено, що якщо клітина втрачає можливість загинути апоптотично, це стає тригерним фактором для запуску механізмів некрозу, що є небажаним, оскільки останній сприяє експансії вогнища ішемії за рахунок залучення до зони запалення нових нейронів [12]. Отже, перспективним можна вважати пошук препаратів, які дозволяють одночасно гальмувати як запрограмовані, так і незапрограмовані шляхи клітинної смерті [6].

Похідне адамантану, синтезоване під керівництвом акад. М. О. Лозинського в Інституті органічної хімії НАН України (1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол, лабораторний шифр ЮК-1, умовна назва адемола), зменшує летальність на рівні мексидолу та цитиколіну на моделі гострого порушення мозкового кровообігу за ішемічним типом, стимулює кровопостачання головного мозку та послаблює деструктивні зміни у перехідній зоні пенумбри, що дозволяє зменшити вторинне вогнище ішемії [9]. Тому доцільно було дослідити — як впливає адемола на активність нейроапоптозу в цих умовах. Цей процес починається з руйнування ядра клітини, з пошкодження дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), тому наявність фрагментованої ДНК є маркером апоптозу [10]. Мета даної роботи — оцінити вплив адемола на інтенсивність нейроапоптозу в корі головного мозку щурів за ішемії-реперфузії (ІР).

Досліди проведено на 32 білих щурах-самцях масою 160—170 г. Експериментальну модель ІР створювали шляхом накладання кліпс на обидві внутрішні сонні артерії під пропофоловим наркозом (60 мг/кг) терміном на 20 хв. Адемола вводили внутрішньоочеревинно (в/о) в умовно ефективній дозі 2 мг/кг, яка чинить максимальний церебропротекторний ефект [9], через 1 год після ІР і далі щодоби. Як референс-препарат застосовували цитиколін у дозі 250 мг/кг в/о у тому ж режимі. Тваринам групи контрольної патології (ІР без лікування), як і контрольним псевдооперованим тваринам (наркоз та препарування сонних артерій без ІР), вводили 0,9 % розчин NaCl (2 мл/кг в/в). Для оцінки фрагментації ДНК в ядрах нейронів негайно після декапітації на 72 год після ІР вилучали лобні частки кори головного мозку. Дослідження виконували методом протокової

цитометрії [1—3; 5] на базі науково-дослідного центру ВНМУ ім. М. І. Пирогова (директор — д-р мед. наук, проф. І. В. Гунас). Для отримання суспензії ядер до тканини додавали спеціальний CyStain DNA фірми Partec (Німеччина) відповідно до інструкції виробника. Використовували одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина). Ядерні суспензії біоптатів кори лобних часток головного мозку щурів готували відразу після забору матеріалу та промивки холодним (+4 — +8°C) фосфатносолевим буфером pH 7,4 (Sigma). Протоковий аналіз проводили на протоковому цитометрі «Partec PAS» фірми Partec, Німеччина. Для збудження флуоресценції мітки ядерної ДНК — діамідинофеніліндолу — використовували ультрафіолетову лампу. З кожного зразка ядерної суспензії проводили аналіз 10 тис. подій. Протоковий аналіз фрагментації ДНК виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (фірма Partec, Німеччина) шляхом виділення Sub-G1 ділянки на ДНК-гістограмах. Статистичне оброблення виконували з використанням критерію t Стюдента.

Типову ДНК-гістограму наведено на рисунку.



Фрагментація ДНК в ядрах клітин кори головного мозку псевдооперованого щура через 72 год. Проточна цитометрія. Кількість подій 10 тис.

У контрольній групі псевдооперованих щурів рівень фрагментації ДНК склав $7,44 \pm 0,80$ % (таблиця).

Вплив адемола та цитиколіну на фрагментацію ДНК в ядрах нейронів лобних часток кори головного мозку щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу з подальшою реперфузією через 72 год ($M \pm m, n = 8$)

Умови досліджу	Фрагментація ДНК, %
Псевдооперовані тварини	$7,44 \pm 0,80$
ГПМК (контрольна патологія)	$17,04 \pm 0,50^*$
ГПМК + адемола (2 мг/кг)	$12,01 \pm 0,56^{*\wedge}$
ГПМК + цитиколін (250 мг/кг)	$14,05 \pm 0,71^{*\#}$

Примітки: * — $p < 0,05$ відносно показника псевдооперованих щурів; # — $p < 0,05$ відносно показника контрольної патології; ^ — $p < 0,05$ відносно показника групи цитиколіну

У групі контрольної патології (ІР без лікування) фрагментація ДНК вірогідно зростає у 2,3 рази — до $17,04 \pm 0,50$ % (табл. 1). Це може вказувати на процес інтенсивного формування вогнища ішемічної напівтіни (пенумбри) саме за рахунок нейроцитів, які перебувають у стані апоптотичної смерті.

Адемола цитиколін вірогідно зменшували фрагментацію ДНК відповідно до $12,01 \pm 0,56$ % та $14,05 \pm 0,71$ %, причому ефект адемола був вірогідно сильнішим ($p < 0,05$). Ці результати свідчать про зменшення інтенсивності нейроаптозу та, очевидно, про скорочення зони пенумбри за рахунок збільшення кількості функціонально активних нейронів.

Таким чином, спроможність адемола та цитиколіну зменшувати фрагментацію ДНК у нейронах, тобто чинити антиапоптотичну дію, може бути одним із механізмів їхньої церебропротекторної дії при постреперфузійних ушкодженнях головного мозку. Адемола слід вважати перспективним церебропротектором.

Проведене дослідження дозволило дійти таких висновків.

Ішемія-реперфузія головного мозку у каротидному басейні щурів супроводжується збільшенням фрагментації ДНК у ядрах нейронів лобних часток у 2,3 рази.

Оригінальне похідне адамантану 1-адамантилетил-окси-3-морфоліно-2-пропанол (умовна назва адемола) значно зменшує інтенсивність фрагментації ДНК, вірогідно перевершуючи цитиколін, що свідчить про антиапоптотичні властивості досліджуваної сполуки.

Адемола можна вважати перспективним церебропротектором.

Список літератури

1. Войткова В. В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы) / В. В. Войткова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 6 (76), Ч. 1. — С. 220—225.
2. Вплив діакамфу гідрохлориду на інтенсивність нейроаптозу при експериментальному порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / [В. В. Шведський, С. Ю. Штриголь, С. І. Мерзлікін, І. Л. Черешнюк] // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2012. — № 2. — С. 49—53.
3. Залесский В. Н. Методы ранней диагностики апоптоза in vitro, in vivo для оценки хронических токсикантов / В. Н. Залесский, Н. В. Великая // Современные проблемы токсикологии. — 2006. — № 1. — С. 78—82.
4. Запальна реакція та прогностичне значення маркерів запалення у хворих із геморагічним характером мозкового інсульту / [А. С. Кость, М. С. Білобрин, Б. Д. Луцик та ін.] // Лабораторна діагностика. — 2010. — № 2 (52). — С. 11—15.
5. Манских В. Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В. Н. Манских // Бюллетень сибирской медицины. — 2004. — № 1. — С. 63—70.
6. Мойбенко А. А. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / А. А. Мойбенко, В. Е. Досенко, А. Н. Пархоменко. — Киев: «Наукова думка», 2008. — 514 с.
7. Рациональная нейропротекция / [И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник и др.]. — Донецк: Издатель Заславский А. Ю., 2009. — 262 с.
8. Роль активных форм кислорода в функциональной активности MAP-киназного каскада, глобальных факторов транскрипции и развитии апоптоза (обзор литературы и собственных исследований) / [Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий и др.] // Журнал Академії медичних наук України. — 2008. — Т. 14, № 2. — С. 203—218.

9. Ходаківський О. А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії / О. А. Ходаківський // Вісник морфології. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 62—65.

10. Knight R. A. Cell death in disease: from 2010 onwards / R. A. Knight, G. Melino // Cell Death Dis. — 2011. — Vol. 2. — P. 202.

11. Role of Apoptosis in disease / [B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano et al.] // Aging. — 2012. — № 5, Vol. 4. — P. 330—349.

12. SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery / [H. L. Liang, F. Sedlic, Z. Bosnjak et al.] // Free Radical Biology and Medicine. — 2010. — Vol. 49, № 10. — P. 1550—1560.

13. Waring P. Apoptosis or programmed cell death / P. Waring, F. J. Kos, A. Mullbacher // Med. Res. Rev. — 2008. — № 11. — P. 219—236.

Надійшла до редакції 19.12.2012 р.

А. А. Ходаковський, І. Л. Черешнюк

*Винницький національний медичний інститут
ім. Н. І. Пирогова (г. Винниця)*

Исследование влияния производного адамантана адемола на фрагментацию ДНК ядер нейронов лобных долей коры при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс

В опытах на крысах с модельным острым нарушением мозгового кровообращения (20-минутная билатеральная каротидная окклюзия с последующей реперфузией) установлено, что введение производного адамантана 1-адамантилэтилокси-3-морфолино-2-пропанол (условное название адемола) в дозе 2 мг/кг внутривентриально в лечебном режиме (через 1 ч после ишемии и далее один раз в сутки через каждые 24 ч в течение 3 дней) лучше цитиколина уменьшает интенсивность фрагментации ДНК ядер нейронов лобных долей головного мозга крыс (маркера нейроапоптоза). Наличие у адемола позитивного моделирующего действия на процессы нейроапоптоза может лежать в основе его церебропротекторного действия. Адемола можно считать перспективным церебропротектором.

Ключевые слова: нейроапоптоз, адемола, цитиколин.

O. A. Khodakivskiy, I. L. Chereschnyuk

*Pirogov Memorial Medical University
(Vinnitsya)*

Investigation of influence of derivate of adamantan ademol on fragmentation of DNA nucleuses of neurons of frontal lobes of cortex under ischemia reperfusion of brain in rats

In experiments on rats with model of acute disorder of encephalic circulation (20 minutes bilateral carotid occlusion with further reperfusion) were established that introduction of derivate of adamantan 1-adamantiloxy-3-morpholino-2-propanol (under conventional name ademol) in dose 2 mg/kg intraabdominal in treatment regimen (in an hour after ischemia and further 1 time a day every 24 hours during 3 days) better than cytikolin decreasing fragmentation of DNA nucleuses of neurons of frontal lobes of brain of rats (marker of neuroapoptosis). Positive modeling influence which has ademol on processes of neuroapoptosis can stay in the base of its cerebroprotective effect.

Ademol can be considered as perspective cerebroprotector.

Key words: neuroapoptosis, ademol, cytikolin.

УДК 616.831-001.31:616.1

В. О. Яворська, І. І. Черненко, Ю. Г. Федченко, О. Б. Бондар, Б. Є. Бондар
Харківська медична академія післядипломної освіти;
Харківський обласний шпиталь для інвалідів війни (м. Харків)

ЗМІНИ У КРОВОПОСТАЧАННІ У ХВОРИХ, ЩО ПЕРЕНЕСЛИ БОЙОВУ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВУ ТРАВМУ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ВАЖКОСТІ

ЧМТ займає одне з провідних місць у формуванні інвалідності серед патології нервової системи. Проведено клініко-інструментальне обстеження. 108 пацієнтів, що перенесли бойову черепно-мозкову травму різного ступеня важкості. Виконано порівняльний аналіз доплерографічних показників мозкового кровообігу у обстежених хворих з різним ступенем тяжкості бойової черепно-мозкової травми. Виявлено різний ступінь вираженості гемодинамічних порушень у різних судинних басейнах за допомогою ультразвукової доплерографії магістральних судин шії (швидкісних характеристик, індексу пульсації, опору та систоло-діастолічного коефіцієнту) в залежності від ступеня тяжкості перенесеної бойової черепно-мозкової травми.

Ключові слова: бойова черепно-мозкова травма, ультразвукова доплерографія, показники церебральної гемодинаміки

Незважаючи на великі досягнення військової медицини в лікуванні гострої черепно-мозкової травми (ЧМТ) в останні роки, збільшується кількість віддалених наслідків травматичних уражень головного мозку, далеко не завжди адекватних тяжкості перебігу (в тому числі і бойової) в гострому періоді травм [7, 10—12, 14, 24, 28, 35, 36, 38], і часто (в 50—80 % спостережень) є причиною часткової або повної непрацездатності [16, 18, 25], а також причиною звільнення

з армії військовослужбовців [17, 19, 20, 22]. ЧМТ займає одне з провідних місць у формуванні інвалідності серед патології нервової системи.

Хворі з наслідками ЧМТ у 55 % вимагають тією чи іншою мірою допомоги в повсякденному житті, 45 % не працюють, 70 % відчують обмеження при взаємних у суспільстві [2, 33]. Хворі з наслідками ЧМТ більш схильні до залежності від алкоголю [21], у 50 % з них на підґрунті неадекватних особистісних реакцій розвиваються стійкі нетрудові настанови [29], що в свою чергу веде до порушення працездатності і в 68,8 % — до інвалідизації [37]. Травматичні uszkodження мозку

© Яворська В. О., Черненко І. І., Федченко Ю. Г., Бондар О. Б., Бондар Б. Є., 2013