

С. Г. Носач, И. Ф. Беленичев, А. С. Шкода, Е. В. Александрова

Влияние производного ксантина – соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга при моделировании внутримозгового кровоизлияния

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: нейропротекция, внутримозговое кровоизлияние, 3-R-ксантины, морфофункциональные характеристики нейронов

В настоящее время концепция нейропротекции при внутримозговом кровоизлиянии состоит в поэтапном назначении средств первичной и вторичной нейропротекции [1].

Первичная нейропротекция включает применение модуляторов кальциевых и натриевых каналов, антагонистов рецепторов NMDA, агонистов рецепторов GABA, а вторичная – антиоксидантов, антагонистов молекул адгезии, нейротрофических факторов, молекул, подобных нейротрофическим факторам, некоторых классов цитокинов [2].

Наилучшим подходом к нейропротекции является применение препаратов, обладающих плеiotропным воздействием: подавлением эксайтотоксичности (воздействие на внесинаптические NMDA-рецепторы), ослаблением повреждающего действия и усилением позитивных эффектов воспаления, отсутствием отрицательного влияния на процессы нейропластичности, которые связаны с взаимодействием возбуждающих аминокислот и синаптических NMDA-рецепторов [3].

С учетом того, что при ишемии мозга и внутримозговом кровоизлиянии активируется несколько каскадов реакций, вызывающих гибель клеток, эффективная нейропротекция требует сложной комбинации препаратов, действующих на различные звенья цепи патофизио-

логических событий по мере эволюции повреждения мозга [4–6].

Особый интерес нейрофармакологов в плане конструирования молекул с заданной нейропротективной активностью, которые впоследствии претендуют на возможность участвовать в комплексной терапии внутримозгового кровоизлияния (ВК), представляют производные 3-R-ксантинов [7, 8].

Предыдущими работами нами была показана высокая нейропротективная, антиоксидантная и энерготропная активность в условиях острой церебральной ишемии нового производного ксантина – соединения С-3 (В-УР-2, гидразид 1,3-диметил-8-N-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты) [9].

Цель исследования – изучение влияния соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс с экспериментальным внутримозговым кровоизлиянием.

Материалы и методы. Экспериментальная часть выполнена на 90 белых беспородных крысах обоего пола, массой 140–160 г. Животных содержали на стандартном рационе питания вивария. Исследования на животных проводили в соответствии с Директивой Европейского Союза 2010/10/63 ЕУ. Внутримозговое кровоизлияние моделировали путем введения 0,1 мл аутокрови, взятой из хвостовой вены на 100 г веса животного в область внутренней капсулы и стриопаллидарных ядер головного мозга [10]. Операцию выполняли под тиопентал-натриевым наркозом (40 мг/кг), с использованием стереотаксической техники. Соединение С-3 вводили перорально

в виде суспензии, стабилизированной Твином-80, сразу после выхода животных из наркоза один раз в сутки на протяжении всего срока наблюдения (4 и 18 суток) в дозе 100 мг/кг. Препараты сравнения животным вводили в следующих дозах: мексидол – 100 мг/кг, пираретам – 500 мг/кг. Часть животных выводили из эксперимента на 4, а часть на 18 сутки под тиопентал-натриевым наркозом. Головной мозг животных помещали на сутки в фиксатор Буэна, и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парапласт. На ротационном микротоме изготавливали срезы IV–V слоев сенсомоторной зоны фронтальной коры толщиной 5 микрон и окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК. [11]. Морфометрические исследования проводили на микроскопе Аxioskop (Ziess, Германия). Изображение нейронов, получаемое на

микроскопе, с помощью высокочувствительной видеокамеры СОНУ-4922 (СОСНУ Inc., США) вводили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS. Определяли: плотность нейронов (количество клеток на 1 мм² площади среза коры мозга); клеточный состав в области IV–V слоев коры (%); площадь тел нейронов (мкм²); содержание РНК в нейронах (единицы оптической плотности, E_{оп}). Результаты исследования обрабатывали с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № АХХR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

Результаты и их обсуждение. Морфометрические исследования показали, что введение аутокрови во внутрен-

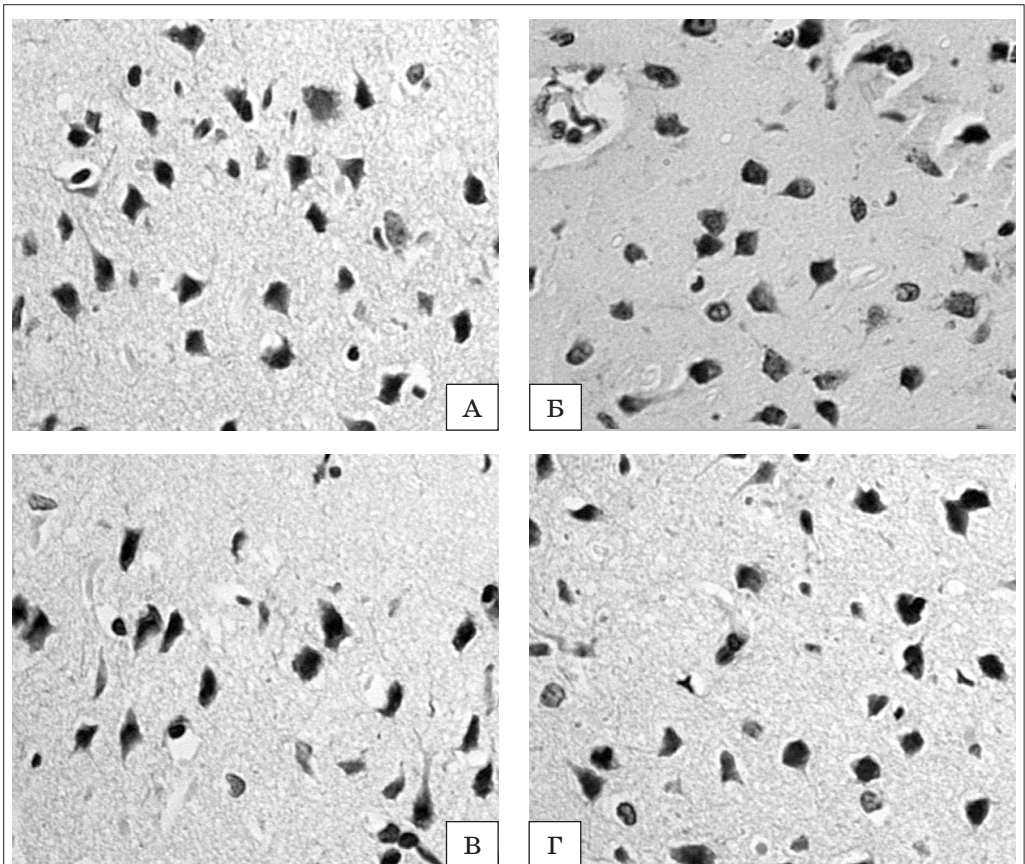


Рисунок. Нейроны сенсомоторной зоны коры головного мозга животных интактной группы (А), крыс с внутримозговым кровоизлиянием (Б), введением пираретама (В) и соединения С-3 (Г) на 4 сутки эксперимента. Окраска галлоцианин-хромовыми квасцами, объектив × 20.

Характеристика нейронов IV–V слоев сенсомоторной коры головного мозга крыс с внутримозговым кровоизлиянием ($M \pm m$)

| Экспериментальная группа | Плотность нейронов, клеток/мм ² | | Площадь тел нейронов, мкм ² | | Содержание РНК в нейронах, E _{оп} | |
|--|--|----------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| | 4 сутки | 18 суток | 4 сутки | 18 суток | 4 сутки | 18 суток |
| Интактные (n = 10) | 1276 ± 11 | 1276 ± 11 | 76,33 ± 1,14 | 76,33 ± 1,14 | 11,87 ± 0,11 | 11,87 ± 0,11 |
| Внутримозговое кровоизлияние, контроль (n = 20) | 1087 ± 11 | 1060 ± 7 | 67,11 ± 0,90 | 66,11 ± 1,10 | 8,77 ± 0,07 | 10,75 ± 0,08 |
| Внутримозговое кровоизлияние + соединение С-3 (n = 20) | 1197 ± 5* ^{0#} | 1224 ± 9* ^{0#} | 73,11 ± 0,70* ⁰ | 75,23 ± 0,37* | 11,76 ± 0,11* ^{0#} | 13,14 ± 0,11* ⁰ |
| Внутримозговое кровоизлияние + пирацетам (n = 20) | 1080 ± 9 | 1189 ± 15* | 63,00 ± 0,50 | 65,71 ± 0,43 ^{Δ*} | 8,81 ± 0,03 ^Δ | 10,65 ± 0,11 |
| Внутримозговое кровоизлияние + мексидол (n = 20) | 1123 ± 8* | 1201 ± 10* | 66,71 ± 1,12 ^{Δ*} | 73,14 ± 0,52* | 9,97 ± 0,14* | 11,83 ± 0,12* |

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к контролю; ⁰ $p < 0,05$ по отношению к пирацетаму; # $p < 0,05$ по отношению к мексидолу.

нюю капсулу головного мозга приводило к достоверному уменьшению плотности нейронов в сенсомоторной зоне коры мозга по сравнению с интактными животными, как на 4, так и на 18 сутки эксперимента (рисунок, таблица). При этом отмечали достоверное уменьшение площади тел нейронов, уменьшение содержания РНК в эти же сроки наблюдения. В сенсомоторной зоне коры мозга ишемизированных крыс увеличивалась (в 1,60–1,75 раз) плотность апоптотических и деструктивно измененных нейронов на 4 и 18 сутки после моделирования ВК. Назначение животным с ВК пирацетама не оказывало достоверного нейропротективного эффекта на 4 сутки наблюдения (плотность и площадь нейронов оставалась на уровне контроля). Нейропротективное действие пирацетама регистрировали только на 18 сутки ВК. Подобное действие пирацетама в условиях ишемического повреждения головного мозга достаточно полно отображено в наших предыдущих работах и работах других исследователей [12–15].

У экспериментальной группы крыс, которые получали мексидол, при анализе морфологических показателей на 4 сутки наблюдали увеличение плотно-

сти и площади тел нервных клеток. Наибольшим нейропротективным эффектом обладало соединение С-3, введение которого приводило к увеличению плотности нейронов на 4 сутки ВК, и по силе данного действия оно достоверно превосходило мексидол и пирацетам. На 18 сутки после ВК соединение С-3 также повышало плотность нейронов, и по силе данного действия оно достоверно превосходило мексидол и пирацетам.

Таким образом, нейропротективное действие соединения С-3, в отличие от референтных препаратов – мексидола и пирацетама, реализуется в остром периоде экспериментальной патологии. В действии соединение С-3 проявляется и позитивное влияние на функциональную активность нейронов, о чем свидетельствует достоверное повышение содержания РНК в клетках на 4 и 18 сутки ВК. Этот факт свидетельствует о повышении транскрипционных и трансляционных процессов в нейроне в условиях ВК при введении соединения С-3. По степени влияния на этот показатель новое производное ксантина С-3 на 4 сутки эксперимента достоверно превосходило пирацетам и мексидол, а на 18 – пирацетам.

Выводы

1. Курсовое внутримозговое введение гидразида 1,3-диметил-8-N-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты (соединение С-3) в дозе 100 мг/кг крысам с экспериментальным внутримозговым кровоизлиянием оказывает достоверное нейропротективное действие.

2. Нейропротективное действие соединения С-3 реализуется в остром периоде экспериментальной патологии и проявляется в позитивном влиянии на морфо-функциональные показатели нейронов IV–V слоев сенсомоторной коры – достоверном повышении плотности нейронов и увеличении содержа-

ния РНК в нейронах как на 4 (наиболее выраженное действие), так и на 18 сутки после внутримозгового кровоизлияния. Данный факт свидетельствует о том, что введение соединения С-3 снижает гибель нейронов и повышает транскрипционные и трансляционные процессы в этих клетках.

3. По степени влияния на морфо-функциональные показатели нейронов в условиях экспериментального внутримозгового кровоизлияния новое производное ксантина С-3 достоверно превосходит на 4 сутки эксперимента пираретам и мексидол, а на 18 – пираретам.

1. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов. – Донецк : ИП Заславский, 2009. – 260 с.
2. *Ginsberg M. D.* Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future / M. D. Ginsberg // *Neuropharmacology*. – 2008. – V. 55 (3). – P. 363–389.
3. *Wahlgren N. G.* Neuroprotection in cerebral ischemia: facts and fancies – the need for new approaches / N. G. Wahlgren, N. Ahmed // *Cerebrovasc. Dis.* – 2004. – V. 12 (suppl. 1). – P. 153–156.
4. *Donnan G. A.* The 2007 Feinberg lecture. A new road map for neuroprotection / G. A. Donnan // *Stroke*. – 2008. – V. 39. – P. 242–248.
5. *Prasad K.* Publication bias perpetuates use of ineffective drugs in stroke / K. Prasad // *Int. J. Stroke*. – 2009. – V. 4 (3). – P. 183–184.
6. Сучасні принципи діагностики та лікування хворих із гострими порушеннями мозкового кровообігу / Ю. П. Зозуля, П. В. Волошин, Т. С. Міщенко [та ін.] // *Методичні рекомендації*. – [2 вид., виправ. та доповн.]. – Харків, 2007. – 64 с.
7. Cerebroprotective activity of 3-benzylxanthine derivative – compound Ale-15, in conditions of bilateral common carotid arteries ligation (ischemic stroke) / Levich S. V., Aleksandrova K. V., Belenichev I. F., Shkoda A. S. // *Int J. Basic Clin Pharmacol.* – 2013. – V. 2 (6). – P. 705–710.
8. Research of energotropic properties of 3-benzylxanthine derivative – prospective neuroprotector / Aleksandrova K. V., Levich S. V., Belenichev I. F., Shkoda A. S. // *Int J. Pharm.* – 2015. – V. 5. – P. 1–4.
9. New xanthine derivative B-YR-2 as antioxidant modulator of post-stroke damage of sensorimotor cortex neurons in rats / Belenichev I. F., Aleksandrova K. V., Nosach S. G. [et al.] // *Elixir Pharmacy*. – 2014. – V. 76. – P. 28286–92.
10. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / Чекман И. С., Губский Ю. И., Беленичев И. Ф. [и др.] // *Методические рекомендации*. – К. : ГФЦ МЗ Украины, 2010. – 81 с.
11. *Пирс Э.* Гистохимия / Э. Пирс. – Москва, 1962. – 962 с.
12. Медицина неотложных состояний / Никонов В. В., Феськив В. Э., Беленичев И. Ф. [и др.]. – Донецк : ИП Заславский, 2012. – 512 с.
13. «Фармакология»: коллективная научная монография: И. Ф. Беленичев, С. В. Горбачева; под ред. В. П. Волкова. – Новосибирск : Изд. «СибАК», 2013 – 194 с.
14. Острая церебральная недостаточность / В.И. Черний, В. Н. Ельский, Г. А. Городник, А. Н. Колесников. – Донецк : ООО «ИПП «Промінь», 2007. – 514 с.
15. *Akhlaq A.* Farooqui Molecular Aspects of Neurodegeneration and Neuroprotection / A. Akhlaq. – Bentham Science Publishers, 2011. – 156 p.

С. Г. Носач, И. Ф. Беленичев, А. С. Шкода, Е. В. Александрова

Влияние производного ксантина – соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга при моделировании внутримозгового кровоизлияния

Современная концепция нейропротекции при внутримозговом кровоизлиянии включает поэтапное назначение средств первичной и вторичной нейропротекции. Настоящая статья представляет собой углубленные исследования нового производного ксантина – гидразида 1,3-диметил-8-N-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты (соединение С-3), которое ранее показало высокую нейропротективную, антиоксидантную и энерготропную активность. *Цель исследования* – изучение влияния соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов сенсомоторной коры крыс с экспериментальным внутримозговым кровоизлиянием.

Изучено влияние соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов IV–V слоев сенсорной зоны коры головного мозга крыс с экспериментальным внутримозговым излиянием – плотность нейронов; клеточный состав в области IV–V слоев коры; площадь тел нейронов, содержание РНК в нейронах. Внутримозговое кровоизлияние моделировали у белых беспородных крыс обоего пола массой 140–160 г (всего 90 животных) путем введения в область внутренней капсулы и стриопаллидарных ядер головного мозга аутокрови, взятой из хвостовой вены. Соединение С-3 вводили в дозе 100 мг/кг/сутки внутримозгово в виде суспензии, стабилизированной Твином-80 в течение 4 и 18 суток. В качестве референс-препаратов использовали мексидол и пирацетам в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг соответственно.

Показано, что курсовое введение гидразида 1,3-диметил-8-N-бензиламиноксантинил-7-уксусной кислоты (соединения С-3) в дозе 100 мг/кг внутримозгово крысам с экспериментальным внутримозговым кровоизлиянием оказывает достоверное нейропротективное действие. Нейропротективное действие соединения С-3 реализуется в остром периоде экспериментальной патологии и проявляется в позитивном влиянии на морфофункциональные показатели нейронов IV–V слоев сенсорной зоны коры – достоверном повышении плотности нейронов и увеличении содержания РНК в нейронах как на 4 (наиболее выраженное действие), так и на 18 сутки после внутримозгового кровоизлияния. Данный факт свидетельствует о том, что введение соединения С-3 снижает гибель нейронов и повышает транскрипционные и трансляционные процессы в этих клетках. По степени влияния на морфофункциональные показатели нейронов в условиях экспериментального внутримозгового кровоизлияния новое производное ксантина С-3 достоверно превосходит на 4 сутки эксперимента пирацетам и мексидол, а на 18 – пирацетам. Таким образом, нейропротективное действие соединения С-3 в отличие от эталонных препаратов реализуется в остром периоде экспериментальной патологии и оказывает позитивное влияние на функциональную активность нейронов.

Ключевые слова: нейропротекция, внутримозговое кровоизлияние, 3-R-ксантини, морфофункциональные характеристики нейронов

С. Г. Носач, І. Ф. Бєленічев, О. С. Шкода, К. В. Александрова
Вплив похідного ксантину – сполуки С-3 на морфофункціональні показники
нейронів сенсорної зони кори головного мозку при моделюванні
внутрішньомозкового крововиливу

Сучасна концепція нейропротекції при внутрішньомозговому крововиливі включає поетапне призначення засобів первинної та вторинної нейропротекції. У статті наведено результати поглибленого дослідження нового похідного ксантину – гідразиду 1,3-диметил-8-N-бензиламіноксантиніл-7-оцтової кислоти (сполуки С-3), яке раніше показало високу нейропротективну, антиоксидантну та енерготропну активність.

Мета дослідження – вивчення впливу сполуки С-3 на морфофункціональні показники нейронів сенсорної зони кори щурів з експериментальним внутрішньомозговим крововиливом.

Вивчено вплив сполуки С-3 на морфофункціональні показники нейронів IV–V шарів сенсорної зони кори щурів з експериментальним внутрішньомозговим крововиливом – щільність нейронів; клітинний склад в області IV–V шарів кори; площа тіл нейронів (мкм²), уміст РНК у нейронах. Внутрішньомозговий крововилив моделювали в білих безпородних щурів обох статей масою 140–160 г (усього 90 тварин) шляхом введення в область внутрішньої капсули та стриопаллидарних ядер головного мозку аутокрові, взятої з хвостової вени. Сполуку С-3 вводили в дозі 100 мг/кг/доба внутрішньозлунково у вигляді суспензії, стабілізованої твін-80, протягом 4 та 18 діб. Як референс-препарати використовували мексидол і пірацетам у дозах 100 і 500 мг/кг відповідно.

Показано, що курсове введення гідразиду 1,3-диметил-8-N-бензиламіноксантиніл-7-оцтової кислоти (С-3) у дозі 100 мг/кг внутрішньозлунково щурам з експериментальним внутрішньомозговим крововиливом чинить нейропротективну дію. Нейропротективна дія сполуки С-3 реалізується в гострому періоді експериментальної патології та проявляється в позитивному впливі на морфофункціональні показники нейронів IV–V шарів сенсорної зони кори – достовірному підвищенні щільності нейронів і збільшенні вмісту РНК у нейронах як на 4 (найвираженіша дія), так і на 18 добу після внутрішньомозгового крововиливу. Даний факт свідчить про те, що введення сполуки С-3 знижує загибель нейронів і підвищує транскрипційні та трансляційні процеси в цих клітинах. За ступенем впливу на морфофункціональні показники нейронів за умов експериментального внутрішньомозгового крововиливу нове похідне ксантину – сполука С-3 достовірно перевершує на 4 добу експерименту пірацетам і мексидол, а на 18 – пірацетам. Таким чином, нейропротективна дія сполуки С-3, на відміну від еталонних препаратів, реалізується в гострому періоді експериментальної патології та справляє позитивний вплив на функціональну активність нейронів.

Ключові слова: нейропротекція, внутрішньомозговий крововилив, 3-R-ксантини, морфофункціональні характеристики нейронів

S. F. Nosach, I. F. Belenichev, A. S. Shkoda, E. V. Aleksandrova
The influence of xanthine derivative – compound C-3 on morphological and functional characteristics of sensorimotor cortex neurons in intracerebral hemorrhage model

The modern concept of neuroprotection during intracerebral hemorrhage includes sequential administration of primary and secondary neuroprotectors. In the article are represented results of in-depth study of a novel xanthine derivative – hydrazide of 1,3-dimethyl-8-N-benzylaminoxanthinyl-7-acetic acid (compound C-3), which previously showed high neuroprotective, antioxidant and energotropic activity. *The aim of the research* was to study the effect of compound C-3 on morphofunctional parameters of neurons of the sensorimotor cortex of rats with experimental intracerebral hemorrhage. We studied effect of compound C-3 on such morphofunctional parameters of neurons of IV–V layers of the sensorimotor cortex of rats with experimental intracerebral hemorrhage – neuronal density (number of cells per 1 mm² area of slice of cerebral cortex), the cellular content in the IV–V layers of the cortex in percentage; area of bodies of neurons (mm²), RNA content in neurons. Intracerebral hemorrhage was modeled in albino rats of both sexes weighing 140–160 g (90 animals) by injection into the region of the internal capsule and striatopallidal cores of the brain autologous blood, which was taken from the tail vein. Compound C-3 was injected at a dose of 100 mg/kg/day intragastrically as a suspension stabilized by Tween-80 during 4 or 18 days. As reference drugs were used mexidol and piracetam at doses of 100 mg/kg and 500 mg/kg, respectively. It was shown that the course administration of hydrazide 1,3-dimethyl-8-N-benzylaminoxanthinyl-7-acetic acid (C-3) at dose 100 mg/kg intragastrically to rats with experimental intracerebral hemorrhage caused a significant neuroprotective effect. Neuroprotective action of compound C-3 was implemented in the acute period of experimental pathology and manifested in a positive influence on the morphological and functional parameters of neurons of IV–V layers of the sensorimotor cortex. a significant increase in neuronal density and an increase in RNA content in the neurons of both the 4th (the most pronounced effect) and on the 18th day after intracerebral hemorrhage. This fact indicates that the injection of the C-3 reduced neuronal damage and improved the processes of transcription and translation in the cells. The level of influence on the morphological and functional parameters of neurons in experimental intracerebral hemorrhage of novel xanthine derivative C-3 significantly superior on the 4th day of the experiment piracetam and mexidol, and on the 18th day – piracetam. Thus, the neuroprotective effect of compound C-3, in contrast to the reference drugs, realized in the acute phase of experimental pathology and had a positive effect on the functional activity of neurons.

Key words: neuroprotection, intracerebral hemorrhage, 3-R-xanthines, morphological and functional parameters of neurons

Поступила: 03.02.2015 г.

Контактное лицо: Беленичев Игорь Федорович, профессор, доктор медицинских наук, кафедра фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, д. 26, просп. Маяковского, г. Запорожье, 69035. Тел.: +38 0 67 976 44 86.
Электронная почта: ibf1914@mail.ru