

ISSN 2074-9457

№3 (69)
2015

ВЕСТНИК ФАРМАЦИИ



ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

И. Н. Подольский, С. Ю. Штрыголь

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ 2-МЕТИЛ-3-ФЕНИЛАМИНОМЕТИЛХИНОЛИН-4-ОНА НА ИЗМЕНЕНИЯ ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕЙРОНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

В статье приведены результаты морфологического исследования влияния 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она (атристамина) на изменения тинкториальных свойств нейронов в сенсомоторной коре (СМК) больших полушарий и коре мозжечка головного мозга крыс в условиях экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Показано, что на фоне модельной патологии развиваются значительные изменения в структурно-функциональной организации СМК и коры мозжечка головного мозга животных. При применении атристамина в дозе 100 мг/кг с целью коррекции нарушений, вызванных ЧМТ, отмечена нормализация соотношения основных типов нейронов СМК практически до уровня интактного контроля. В клетках Пуркинью коры мозжечка уменьшалась выраженность хроматолиза и деструктивных изменений, сохранялась их упорядоченность. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что церебропротекторное влияние атристамина (100 мг/кг) после ЧМТ носит более выраженный характер по сравнению с референс-препаратом пирацетамом (400 мг/кг).

Ключевые слова: 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-он, черепно-мозговая травма, нейропротекторная активность, морфологическое исследование, тинкториальные свойства нейронов.

ВВЕДЕНИЕ

Травматические повреждения черепа и головного мозга составляют 30–40% всех травм и занимают первое место по показателям летальности и инвалидизации среди лиц трудоспособного возраста. По данным ВОЗ, каждый год в мире получают черепно-мозговую травму (ЧМТ) более 10 млн. человек [1]. При этом количество пациентов с ЧМТ из года в год растет, что актуализирует поиск новых и более эффективных средств для облегчения последствий перенесенной патологии.

ЧМТ инициирует ряд различных патобиохимических гуморальных реакций, которые опосредованно усиливают повреждение мозговой ткани, вызванное первичным механическим воздействием [2]. Поскольку не существует каких-либо способов коррекции первичного звена патогенеза – биомеханической альтерации ткани мозга, то основным направлением

фармакотерапии является предотвращение развития вторичных процессов, которые включают высвобождение нейромедиаторов, генерацию свободных радикалов, кальций-опосредованные повреждения, активацию генов, нарушения функций митохондрий и воспалительные реакции [3]. Для этого в современной медицинской практике применяются различные группы лекарственных средств (ЛС), интегральным результатом действия которых является защита клеток мозга от гибели [4].

Одними из наиболее распространенных и социально значимых отдаленных последствий перенесенной ЧМТ являются депрессивные расстройства [5]. В долгосрочной перспективе пациенты в восстановительном периоде после ЧМТ в подавляющем большинстве случаев применяют ЛС из группы антидепрессантов [6]. Как следствие, актуальным остается вопрос поиска новых лекарственных средств, которые можно

применять в медицинской практике с первых часов после ЧМТ как с целью нейропротекции, так и для профилактики возможных депрессивных расстройств.

Объектом данного исследования является 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-он (атристамин), который был синтезирован на кафедре медицинской химии Национального фармацевтического университета и изучается как перспективный антидепрессант с ноотропными свойствами (рисунок 1) [7–9].

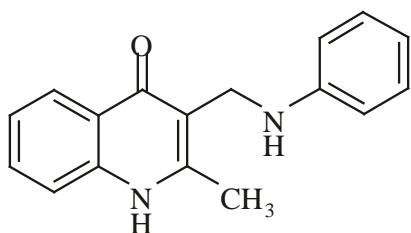


Рисунок 1 – Структурная формула 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4она (атристамина)

Ранее на модели экспериментальной ЧМТ с использованием поведенческих тестов (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, плавательный тест Порсолта, плавание с нагрузкой, удерживание на вертикальной сетке, экстраполяционное избавление) была доказана способность атристамина облегчать последствия перенесенной травмы [10]. Для различных антидепрессантов вообще характерны нейропротекторные свойства [11, 12]. Эти предпосылки послужили основанием для углубленного изучения церебропротекторных свойств исследуемого вещества.

Цель исследования: морфологическое изучение церебропротекторного влияния 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она на изменения тинкториальных свойств нейронов в головном мозге крыс при коррекции нарушений, возникающих вследствие ЧМТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на базе ЦНИЛ НФаУ на 20 рандомбредных белых крысах-самках массой 200–240 г с соблюдением биоэтических требований в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Протокол морфологического исследования был полностью гармонизирован с протоколом эксперимента, в котором изучалась нейропротекторная активность атристамина после ЧМТ с использованием поведенческих тестов [10].

Лабораторные животные были рандомизированы в 4 экспериментальные группы:

- 1) интактная группа (n=5) – животных наркотизировали без воспроизведения ЧМТ;
- 2) группа контрольной патологии (n=5) – животных наркотизировали и воспроизводили ЧМТ без дальнейшего лечения;
- 3) группа атристамина (n=5) – животным на фоне модельной патологии вводили атристамин в дозе 100 мг/кг;
- 4) группа пирацетама (n=5) – животным на фоне модельной патологии вводили пирацетам в дозе 400 мг/кг.

2-Метил-3-фениламинометилхинолин-4-он (атристамин) синтезировали аминометилированием 2-метил-1Н-хинолин-4-она по реакции Манниха с последующим переаминированием при взаимодействии с анилином [13]. В эксперименте использовали пирацетам в виде 20% раствора для инъекций (ПАТ «Фармак», Киев). Пирацетам выбран для сравнения на основании того, что он рекомендуется действующим протоколом лечения ЧМТ [14], а доза (400 мг/кг) находится в диапазоне терапевтических в

экспериментальной нейрофармакологии [15, 16].

ЧМТ воспроизводили путем нанесения механической травмы грузом массой 50 г на теменно-затылочную область свода черепа крыс под легким эфирным наркозом. Груз опускали с высоты 60 см. Энергия удара составляла 0,294 Дж [17].

Атрисамин и пирацетам вводили животным внутривентрикулярно при помощи специального металлического зонда (атрисамин в виде тонкой водной суспензии, стабилизированной твином-80; пирацетам – в виде водного раствора) за 30 минут до индукции ЧМТ и один раз в сутки в течение последующих двух дней. Последнее введение – за 30 минут до извлечения мозга. Животные интактной группы и группы контрольной патологии получали эквивалентный объем изотонического раствора внутривентрикулярно по аналогичной схеме.

Головной мозг извлекали у наркотизированных крыс (тиопентал-натрий, 60 мг/ кг, внутривентрикулярно) и целиком фиксировали в 96% этаноле, затем делали фронтальные срезы на уровне передних краев височных долей и коры мозжечка. Образцы заливали в целлоидин-парафин, резали на санном микротоме. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали тионином по методике Ниссля [18].

Просмотр микропрепаратов проводили под световым микроскопом Granum, микрофотосъемки микроскопических изображений осуществляли цифровой видеокамерой Granum ДСМ 310. Фотографии обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Tour View.

В полученных микропрепаратах оценивали качественные изменения в нейронах сенсомоторной коры и клетках Пуркинье коры мозжечка. Для углубленного изучения нарушений в СМК при помощи стандартной морфометрической сетки определяли

относительное содержание нейронов основных структурно-функциональных типов (все слои), которые отличались между собой по интенсивности окраски и дифференцировались в соответствии с известными литературными данными [19, 20]. Все измерения выполняли в поле зрения микроскопа (окуляр – 10, объектив – 40) в 5 повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе интактного контроля функциональное состояние пирамидных нейронов СМК находилось в пределах нормы (рисунок 2 а, см. обложку журнала). В перикарионе преимущественного большинства нейронов содержался тигроид, который в виде базофильных мелких включений достаточно равномерно заполнял нейроплазму – нормохромные нейроны (79,5%), то есть клетки, которые

находятся в состоянии умеренной активности (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние атристамина и пирацетама на распределение основных структурно-функциональных типов нейронов СМК больших полушарий головного мозга крыс после ЧМТ

Группа животных	Основные структурно-функциональные типы нейронов, % (min; max)			
	Нормохромные	Гипохромные	Гиперхромные	Промежуточные
Интактный контроль	79,5 (78; 81)	6,8 (6,6; 7,5)	6,3 (5,9; 6,7)	6,7 (6,3; 7,9)
ЧМТ (контрольная патология)	63,7* (57; 64)	12,2* (9,9; 14,6)	10,8* (10,2; 11,9)	14,8* (12,6; 16,2)
ЧМТ + атристамин, 100 мг/кг	77,3# (69; 80)	7,3# (6,8; 10,8)	8,6* (7,5; 9,5)	6,8#s (6,3; 9,9)
ЧМТ + пирацетам, 400 мг/кг	68,7* (68; 72)	10,5* (10,0; 10,6)	8,6* (8,2; 10,0)	11,5* (10,7; 12,5)

Примечание: * – $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни) относительно группы интактного контроля; # – $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни) относительно группы контрольной патологии; § – $p \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни) относительно группы пирацетама.

Достаточно редко (6,3%) встречались гиперхромные нейроны (сплошное окрашивание клетки, ядро практически не просматривается). Считается, что такие клетки находятся в неактивном состоянии и представляют собой пул нейронов, за счет которых происходит функциональное восстановление мозга после различных повреждающих воздействий [21]. Наблюдались также и немногочисленные (6,8%) гипохромные нейроны (в нейроплазме снижено содержание тигроида, клетки имеют бледную окраску). Предполагается, что эти клетки долгое время находились на пике функциональной активности, а на момент исследования в них произошло истощение компенсаторных механизмов и, соответственно, снижение активности [21].

Кроме того, были дифференцированы (6,7%) промежуточные формы нейронов (IV типа) – клетки с признаками метаболических нарушений, для которых характерными являются увеличенное в размерах ядро и конденсация хроматина при сохранении нормохромности цитоплазмы [22].

В большинстве клеток Пуркинье в коре мозжечка также наблюдался нормального состояния тигроид, который достаточно равномерно распределен по нейроплазме нейронов (рисунок 3 а, см. обложку журнала). Встречались отдельные гиперхромные клетки, которые характеризуются нечеткими очертаниями ядра.

У животных после перенесенной ЧМТ произошли значительные изменения в

соотношении основных структурно-функциональных типов нейронов СМК (таблица 1). На фоне модельной патологии при отсутствии фармакокоррекции на 19,9% ($p < 0,05$) уменьшилась численность нормохромных нейронов, возросло количество гипохромных (на 79,4%, $p < 0,05$) и промежуточных (на 120,9%, $p < 0,05$) нейронов. Отмечалось также значительное увеличение числа гиперхромных нейронов – на 71,4% ($p < 0,05$) относительно интактного контроля.

У некоторых нейронов наблюдалась вакуолизация нейроплазмы, а также отмечались признаки хроматолиза (лизиса тигроида) различной степени выраженности (рисунок 2 б, см. обложку журнала), что является морфологическим свидетельством уменьшения резервных энергетических и пластических ресурсов этих клеток [23]. Большинство наблюдаемых гиперхромных нейронов имели признаки патологических изменений – сморщивание ядра и нейроплазмы.

В коре мозжечка после перенесенной травмы отмечалось распространение признаков хроматолиза среди клеток Пуркинье. Более того, отмечались значительные зоны «выпадения, исчезновения» клеток Пуркинье из ряда (рисунок 3 б, см. обложку журнала).

У животных из группы, которой вводили атристамин, в популяции нейронов СМК по сравнению с группой контрольной патологии на 21,4% ($p < 0,05$) была увеличена численность нормохромных нейронов (практически достигала уровня интактного контроля). На 40,2% ($p < 0,05$) относительно группы нелеченных животных уменьшилось количество гипохромных нейронов и практически в 2,2 раза ($p < 0,05$) – промежуточных (IV типа), то есть эти показатели также восстановились

практически до уровня нетравмированных крыс (таблица 1).

Таким образом, на фоне лечения атристамин в целом уменьшается количество нейронов с признаками метаболического неблагополучия. Пул гиперхромных нейронов достоверно не изменяется сравнительно с контрольной патологией, однако при этом визуальных признаков патологических изменений в большинстве нейронов данного типа не отмечалось (рисунок 2 в, см. обложку журнала), что дает основания расценивать этот факт как увеличение численности клеток резерва. Значительное ослабление признаков хроматолиза в нейронах под влиянием атристамина также следует отнести к проявлениям церебропротекторных свойств исследуемого вещества.

В коре мозжечка животных данной группы в клетках Пуркинье уменьшалась выраженность хроматолиза (рисунок 3 в, см. обложку журнала), а также сохранялась их упорядоченность. Однако прослеживались отдельные случаи гипохромии.

При визуальном анализе микросрезов СМК и коры мозжечка животных, которым вводили пирацетам, были получены неоднозначные результаты по характеру влияния данного лекарственного средства на состояние нейронов (рисунки 2 г, 3 г, см. обложку журнала). Этот факт подтверждается и данными морфометрического анализа (таблица 1): количество нормохромных нейронов в данной группе увеличилось на 7,8% относительно контрольной патологии, а показатели для гипохромных, гиперхромных и промежуточных (IV типа) нейронов уменьшились на 13,4%, 20,4% и 22,3% соответственно, однако указанные изменения не достигали достаточного уровня достоверности. Таким образом, на фоне лечения пирацетамом наблюдается тенденция к ослаблению изменений

структурно-функциональной организации исследованных отделов головного мозга крыс, которые связаны с черепно-мозговой травмой, а полученные результаты полностью согласуются с данными эксперимента с использованием поведенческих тестов [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. С целью экспериментального изучения церебропротекторной активности 2-метил-3-фениламинометилхинолин-4-она (атристамина) при коррекции нарушений, возникающих вследствие перенесенной черепно-мозговой травмы (ЧМТ), проведено морфологическое исследование сенсомоторной коры больших полушарий и коры мозжечка (клетки Пуркинье) головного мозга крыс.

2. После индукции модельной ЧМТ у животных группы контрольной патологии произошли значительные изменения в соотношении основных структурно-функциональных типов нейронов СМК: достоверно уменьшилось количество нормохромных нейронов, а также резко возросла численность клеток с признаками метаболического неблагополучия. В коре мозжечка после перенесенной травмы отмечалось распространение признаков хроматолиза среди клеток Пуркинье, наблюдались значительные зоны «выпадения».

3. На фоне применения атристамина (100 мг/кг) после ЧМТ отмечалась нормализация соотношения структурно-функциональных типов нейронов СМК практически до уровня интактного контроля. В клетках Пуркинье коры мозжечка уменьшалась выраженность хроматолиза и деструктивных изменений, сохранялась их упорядоченность, что свидетельствует о церебропротекторном влиянии исследуемого вещества в условиях данной модельной патологии.

4. При применении пираретама (400 мг/кг) все исследуемые показатели имели тенденцию к нормализации, однако ни в одном из случаев различия не носили достоверного характера по сравнению с группой контрольной патологии.

5. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после ЧМТ церебропротекторное влияние атристамина носит более выраженный характер по сравнению с референс-препаратом пираретамом, что полностью согласуется с интегральными эффектами исследуемого вещества в экспериментах с использованием поведенческих методик.

SUMMARY

I. M. Podolsky, S. Yu. Shtrygol
RESEARCH OF THE
CEREBROPROTECTIVE
EFFECT OF 2-METHYL-
3-PHENYLAMINOMETHYLQUINOLIN-4-
ONE ON CHANGES OF TINCTORIAL
PROPERTIES OF NEURONS IN RAT
BRAIN AFTER TRAUMATIC BRAIN
INJURY

The article presents the results of morphological study of the effect of 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one (atristamine) on changes of tinctorial properties of neurons in the sensorimotor cortex (SMC) of the cerebral hemispheres and the cerebellar cortex of rat brain in experimental traumatic brain injury (TBI) conditions. It has been shown that significant changes in the structural and functional organization of the SMC and the cerebellar cortex develop in the context of the model pathology. When applying atristamine in dose 100 mg/kg to correct disorders caused by head injury, the normalization of the ratio of main types of neurons in the SMC to the intact control level has been observed. The severity of chromatolysis and destructive changes in the Purkinje cells of cerebellum cortex after administration of atristamine was reduced, and the order of cells was remained. Analysis

of the results shows that the cerebroprotective effect of atristamine (100 mg/kg) after TBI is more pronounced as compared to the reference drug piracetam (400 mg/kg).

Keywords: 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one, traumatic brain injury, neuroprotective activity, morphological research, tinctorial properties of neurons.

ЛИТЕРАТУРА

1. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації екстреної медичної допомоги: наказ МОЗ України №34 від 15.01.2014. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20140115_0034.html. – Дата доступу: 17.06.2015.

2. Gaetz, M. The neurophysiology of brain injury / M. Gaetz // Clin. Neurophysiol. – 2004. – Vol. 115(1). – P. 4–18.

3. Maas, A. I. R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults / A.I.R. Maas, N. Stocchetti, R. Bullock. – Lancet Neurol. – 2008. – Vol. 7. – P. 728–741.

4. Loane, D. J. Neuroprotection for traumatic brain injury / D. J. Loane, B. A. Stoica, A.I. Faden // Handbook of Clinical Neurology. – 2015. – Vol. 127. – P. 343–366.

5. Rates of major depressive disorder and clinical outcomes following traumatic brain injury / C. H. Bombardier [et al.] // JAMA. – 2010. – Vol. 303(19). – P. 1938–1945.

6. Fann, J. R. Treatment for depression after traumatic brain injury: a systematic review / J.R. Fann, T. Hart, K.G. Schomer // J Neurotrauma. – 2009. – Vol. 26(12). – P. 2383–2402.

7. Скринінгові дослідження 3-амінометил-2-метилхінолін-4-онів як потенційних психотропних засобів / С.Ю. Штриголь [та інш.] // Клінічна фармація. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 35–38.

8. 2-Метил-3-фениламинометилхинолин-4-он –

потенціальний антидепресант с ноотропними свойствами / С.Ю. Штриголь [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 4.

– С. 7–9.

9. Подольський, І. М. Вплив перспективного антидепресанта з ноотропними властивостями 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону на фази пам'яті / І. М. Подольський, С. Ю. Штриголь, І. С. Гриценко // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. 104–107.

10. Podolsky, I. M. Neuroprotective activity of 2-methyl-3-phenylaminomethylquinolin-4-one in experimental traumatic brain injury in rats / I. M. Podolsky, S. Yu. Shtrygol // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2015. – Vol. 7, № 4. – P. 518–524.

11. The neurotrophic and neuroprotective effects of psychotropic agents / J. Hunsberger, D. R. Austin, I. D. Henter, G. Chen // Dialogues Clin Neurosci. – 2009. – Vol. 11(3). – P. 333–348.

12. Burns, M. M. Antidepressants in the treatment of stroke / M. M. Burns, D. A. Greenberg // Expert Rev Neurother. – 2010. – Vol. 10(8). – P. 1237–1241.

13. 3-Диметиламинометил-2-метил-1Н-хинолин-4-он – ефективний реагент в синтезі 3-амінометилзамещених хинолонов / В. А. Зубков [и др.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2005. – Т. 3, № 2(10). – С. 23–27.

14. Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Медицина невідкладних станів":

- наказ МОЗ України №24 від 17.01.2005. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20050117_24.html. – Дата доступа: 17.06.2015.
15. Шатілов, О. В. Експериментальне вивчення ноотропних та церебропротекторних властивостей похідних (2-оксоіндолініліден-3)-оцтової кислоти: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.В. Шатілов. – Одесса: ОНМУ, 2014. – 20 с.
16. Жилияев, С. О. Експериментальне обґрунтування використання препаратів кверцетину в різних лікарських формах при черепно-мозковій травмі: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / С.О. Жилияев. – Харків: НФаУ, 2014. – 21 с.
17. Ельский, В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев. – Донецк: Новый мир, 2008. – 140 с.
18. Меркулов, Г. А. Курс патолого-гистологической техники / Г. А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
19. Квитницкий-Рыжов, Ю. М. Современные представления о «тёмных» клетках головного мозга человека и животных / Ю. М. Квитницкий-Рыжов, Т. Ю. Квитницкая-Рыжова // Цитология. – 1981. – № 2. – С. 116–128.
20. Насибуллин, Б. А. Структурно-метаболическое типирование нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс / Б. А. Насибуллин // Деп. в УкрНИИНТИ 14.03.91 г., № 346-УК.91. – 7 с.
21. Каптарь, В. С. Влияние полидана и пираретама на условно-рефлекторную память и структурно-функциональное состояние нейронов неокортекса крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.С. Каптарь. – Москва: МГУ, 2007. – 24 с.
22. Насибуллин, Б. А. Сравнительная структурно-функциональная характеристика сенсомоторной коры головного мозга крыс в динамике алкоголизации и при действии феназепема на этом фоне / Б. А. Насибуллин, Д. М. Пыхтеев // Медицинские исследования. – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 59–60.
23. Гуляев, С. М. Морфологическая оценка церебропротекторного действия лантана ацетата при хронической ишемии головного мозга у крыс / С. М. Гуляев, И. О. Убашеев, Н. М. Кожевникова // Морфология. – 2007. – Т. 132, № 4. – С. 24–27.

Адрес для корреспонденции:

61168, Украина,
г. Харьков, ул. Блюхера, 4,
Национальный фармацевтический
университет, кафедра
медицинской химии, тел. + 38-
(0572)-67-92-04, e-mail:
medchem@niph.edu.ua,
Подольский И. Н.

Поступила 30.06.2015 г.