



УДК: 616-005.4:615.015:577.27

## ИЗУЧЕНИЕ АПОПТОЗМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ АДЕМОЛА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОГО ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПО ЕГО ВЛИЯНИЮ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ РАННЕГО РЕАГИРОВАНИЯ

**А.А. ХОДАКОВСКИЙ<sup>1</sup>**  
**С.В. ПАВЛОВ<sup>2</sup>**  
**Н.В. БУХТИЯРОВА<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup> Винницкий национальный  
медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова

<sup>2)</sup> Запорожский государственный  
медицинский университет

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

В опытах на крысах установлено, что модельное острое нарушение мозгового кровообращения (билатеральная каротидная окклюзия) сопровождается преобладанием в очагах ишемии некротического типа гибели нейронов, а в зоне ишемической полутени – активацией процессов апоптоза. Экспериментальная терапия крыс с инфарктом головного мозга производным адамантана

1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола гидрохлоридом (условное название адемола) в дозе 2 мг/кг внутривенно в лечебном режиме (через 1 час после моделирования инсульта и далее через каждые 24 ч в течение 21 суток) подавляет процессы некротизации нейронов в ишемических очагах и способствует трансформации морфологического типа клеточной смерти с некротического на более «мягкий» апоптотический. Одновременно в зоне пенумбры имеет место угнетение апоптоза, о чем свидетельствует гиперэкспрессия генов *c-fos* и *bcl-2*. Такое корригирующее воздействие адемола на типы гибели нейронов может быть одним из механизмов его церебропротекторного действия.

Ключевые слова: адемола, церебральная ишемия, экспрессия генов, апоптоз.

Эффективность внедрения новых методов патогенетической терапии ишемического инсульта определенным образом зависит от ответа на вопрос о том, какой вид клеточной смерти преобладает в ходе развития острой церебральной ишемии. Эта проблема приобретает особое практическое значение, поскольку регенераторный потенциал нейронов резко ограничен и потеря даже части клеток может закончиться фатально. Вклад некротической и апоптотической смерти нейронов в общую массу поврежденной нервной ткани достаточно вариабельна и зависит от многих условий. Учитывая сложность методик и быструю элиминацию апоптотических клеток, оценка их суммарной доли в ишемизированной области головного мозга является непростой задачей [1,3]. Дискутабельным остается вопрос, какой вид гибели клеток является наиболее благоприятным для головного мозга с точки зрения функциональных последствий: апоптоз или некроз.

Согласно современным представлениям, при остром нарушении мозгового кровообращения (ОНМК) непосредственно в очагах ишемии за счет почти полного отсутствия синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) преобладают процессы некротической гибели нейронов, а в зоне ишемической полутени – пенумбре – сравнительно меньший энергодефицит способствует инициации механизмов апоптоза [1,7,8]. Апоптотическая гибель, при которой клетки утилизируются путем образования апоптотических телец и их последующего фагоцитоза, в сравнении с некрозом считается более благоприятной. В отличие от апоптоза, некроз клетки сопровождается ее вакуолизацией, набуханием, лизисом мембран, выходом клеточного содержимого в межклеточное пространство с усилением синтеза провоспалительных медиаторов, в т.ч. цитокинов, нарастанием воспалительного процесса. Следовательно, некроз является более грубым нарушением тканевых структур [4]. Одним из немногих путей восстановления их морфо-функциональной способности является трансформация типа клеточной смерти с некроза на апоптоз и одновременная активация антиапоптотических факторов. В последнее время появилось достаточное количество экспериментальных данных, которые свидетельствуют, что именно соотношение экспрессии генов раннего реагирования *c-fos* и антиапоптотических генов семейства *bcl* в различные сроки острой церебральной недостаточности предопределяет путь гибели нейронов [2,9].

Поиск новых веществ, церебропротекторное действие которых было бы обусловлено непосредственным корригирующим воздействием на соотношение различных механизмов клеточной смерти в условиях ОНМК, является актуальной задачей современной фармакологии.



Одним из таких перспективных соединений может стать синтезированное под руководством акад. М.О. Лозинского в Институте органической химии НАН Украины производное адаманта-на 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанол гидрохлорид (лабораторный шифр ЮК-1, условное название адемола). Адемола обладает защитным действием на ишемизированный мозг. На это указывает его способность уменьшать летальность на уровне мексидола и цитиколина в условиях модельного ОНМК по ишемическому типу, стимулировать кровоснабжение головного мозга и ослаблять деструктивные изменения в переходной зоне пенумбры, что позволяет уменьшить вторичный очаг ишемии [6]. Поэтому целесообразно было исследовать влияние адемола на активность нейроапоптологических процессов в этих условиях.

**Цель исследования.** Охарактеризовать влияние адемола на реализацию различных путей гибели нейронов в условиях ишемического поражения головного мозга как одного из возможных механизмов его церебропротекторного действия.

**Материалы и методы.** Влияние адемола на реализацию различных механизмов нейрональной смерти изучали на модели необратимой билатеральной каротидной окклюзии (БКО) у крыс, которую выполняли под пропофоловым наркозом («FreseniusKabi», Австрия), 60 мг/кг внутривентриально (в/в). Выбранная модель позволяет воспроизвести клиническую картину ишемического инсульта [5]. 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 21 суток. Референс-препарат цитиколин («FerrerSnternational, S. A.», Испания) (250 мг/кг) вводили в лечебном режиме по аналогичной схеме.

После завершения опыта в соответствующие сроки (на 4-е и 21-е сутки после моделирования ОНМК) животных выводили из эксперимента путем передозировки тиопентала натрия. Для гистоиммунохимических исследований мозг помещали на 24 ч в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. На ротационной микротоме изготавливали 15-микронные срезы сомато-сенсорной коры. Для выявления экспрессии белков c-fos и bcl-2 в коре использовали иммуногистохимический метод непрямой иммунофлуоресценции. Первоначально на срезы наносили первичные антитела к белкам c-fos и bcl-2 (Sigma Chemical, USA) и инкубировали при комнатной температуре 60 мин. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером. Исследование c-fos- и bcl-2-иммунопозитивных нейронов осуществляли на флуоресцентном микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COHU Inc., США) и вводили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS. Анализ изображений проводился в автоматическом режиме [2].

Таблица

**Динамика количества c-fos- и bcl-2-положительных нейронов в коре головного мозга крыс с острой церебральной ишемией (слой IV-V) на фоне лечебного внутривентриального введения адемола (2 мг/кг) или цитиколина (250 мг/кг) (M±m, n=10)**

Группа	Количество c-fos-позитивных нейронов (на 1 мм <sup>2</sup> )	Количество bcl-2-позитивных нейронов (на 1 мм <sup>2</sup> )
Интактные животные	26,40±1,73	97,80±2,23
4-е сутки церебральной ишемии		
ОНМК+ 0,9 % NaCl (контроль)	11,70±0,82* (-55,68%)	19,20±1,04* (-80,37%)
ОНМК + адемола	17,60±0,73*#^ (-33,34%) [+50,43%]	41,00±1,10*#^ (-58,08%) [+113,54%]
ОНМК+ цитиколин	11,70±0,60* (-55,68%) [0%]	29,10±1,25*# (-70,25%) [+51,56%]
21-е сутки церебральной ишемии		
ОНМК без лечения (контроль)	13,20±0,66* (-50,0%)	24,40±0,58* (-75,05%)
ОНМК + адемола	38,40±1,40*#* (+45,45%) [+190,90%]	53,20±1,25*#* (-45,60%)
ОНМК + цитиколин	39,30±1,31*# (+48,86%) [+197,72%]	51,40±1,21*# (-47,43%)

Примечание. Статистически значимые различия (p<0,05): – с показателем интактных животных, # – с контрольной патологией, ^ – с эффектом цитиколина, \* – относительно 4 суток. В круглых скобках –



изменение (%) относительно показателя интактных животных, в квадратных скобках – относительно показателя контрольной группы.

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

**Результаты и обсуждение.** При гистоиммунохимической оценке динамики экспрессии гена раннего реагирования *c-fos* в сомато-сенсорной коре головного мозга крыс с ОНМК установлено, что на 4-е сутки после необратимой билатеральной окклюзии сонных артерий в нейронах наблюдалось достоверное снижение содержания белка *c-fos* (табл.).

В пользу такого утверждения указывает уменьшение количества *c-fos*-положительных нейронов в коре головного мозга в условиях данной патологии в среднем на 55,68% ( $p < 0,05$ ).

Такое интенсивное (более чем вдвое) снижение экспрессии исследуемого гена может свидетельствовать о преобладании некротического типа гибели нейронов в очаге ишемии. По нашему мнению, это связано с отсутствием кровоснабжения ишемического очага, что обуславливает значительный энергодефицит и почти полную блокаду синтеза АТФ. Некротический тип гибели нейронов, в отличие от апоптотического пути, является энергонезависимым процессом, т.е. для его инициации не требуется АТФ. В то же время, в зоне ишемической полутени (пенумбры) кровоснабжение полностью не прекращается, а поддерживается на определенном уровне за счет существования коллатералей, что позволяет поддерживать синтез АТФ на минимальном уровне, достаточном для реализации процессов апоптоза. Как свидетельствуют данные литературы [1,7], такие условия, наряду с развитием оксидативного стресса, являются основой для формирования митохондриальной поры, через которую в цитоплазму из митохондрий выходит ряд апоптогенных факторов, в частности цитохром *c*. При условии синхронного снижения количества антиапоптотических факторов, например антиапоптотического белка *bcl-2*, происходит инициация запрограммированных механизмов клеточной смерти (нейроапоптоз) [2].

При исследовании количества *bcl-2*-позитивных нейронов в коре головного мозга крыс в остром периоде ОНМК (4 сутки ишемии) отмечено их значительное снижение относительно интактных животных (в среднем на 80,37%,  $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать об активации процессов нейроапоптоза в зоне пенумбры (табл.).

В восстановительном периоде церебральной ишемии (21 сутки) за счет развития адаптационных процессов в коре головного мозга крыс с ОНМК отмечалась слабая тенденция к повышению активности экспрессии белка *c-fos* и содержания в нейронах антиапоптотического белка *bcl-2*.

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать вывод, что при необратимой окклюзии сонных артерий в очаге ишемии за счет почти полного отсутствия синтеза АТФ преобладают процессы некротической гибели нейронов, а в зоне пенумбры сравнительно меньший энергодефицит способствует инициации механизмов нейроапоптоза.

Адемола при терапевтическом курсовом введении крысам с ОНМК способствовал усилению экспрессии гена *c-fos* уже на 4-е сутки после начала лечения. Так, количество *c-fos*-позитивных нейронов сомато-сенсорной зоны коры головного мозга оставалась ниже по сравнению с интактными крысами в среднем на 33,34% ( $p < 0,05$ ) и достоверно повысилось относительно контрольной группы в среднем на 50,43%. Синхронно с такими изменениями экспрессии исследуемого гена в группе леченных адемолом животных происходило достоверное относительно контроля повышение количества *bcl-2*-позитивных нейронов в нейронах зоны пенумбры в среднем на 113,54% (табл.). Такой эффект адемола, по нашему мнению, может быть одним из ведущих механизмов его церебропротекторного действия в условиях ОНМК, поскольку подобный по своей направленности и по характеру модулирующего воздействия на содержание в ишемизированных нейронах про- и антиапоптотических белков изменяет их морфологический тип смерти с некротического на более «мягкий» апоптотический в зоне ишемии, одновременно уменьшая роль последнего в области ишемической полутени. Нейроапоптоз в зоне ишемии является наиболее оптимальным и упорядоченным процессом прекращения жизнедеятельности деструктивно измененных нейронов, при котором стабилизируются клеточные мембраны, а клетки утилизируются путем образования апоптотических телец и их фагоцитоза без развития неконтролируемой воспалительной реакции [4]. Торможение ранних механизмов нейроапоптоза в участках пенумбры, где поддерживается минимальное кровоснабжение, является одним из возможных путей сохранения их дальнейшей жизнеспособности, поскольку апоптоз (до определенного времени), в отличие от некроза, представляет собой потенциально обратимый процесс [8].

В отличие от адемола, экспериментальная терапия крыс в течение первых 4 суток ОНМК цитиколином не способствовала достоверному изменению экспрессии гена раннего реагирования *c-fos* в нейронах коры головного мозга относительно группы, которая получала



только физиологический раствор. Это может свидетельствовать (как и в контроле) о преобладании в очаге ишемии процессов некротической смерти нейронов (табл.).

Анализ количества bcl-2-позитивных нейронов свидетельствует, что в остром периоде референс-препарат способствует их достоверному увеличению по сравнению с контролем в среднем лишь на 51,56%, то есть по данному показателю цитиколин уступает производному адамантана почти 1,4 раза (табл.). Следовательно, в течение первых 96 ч ОНМК терапия крыс цитиколином оказывает умеренное модулирующее действие на процессы нейроапоптоза преимущественно в зоне пенумбры, не меняя морфологический тип гибели нейронов непосредственно в очаге ишемии.

Дальнейшая терапия крыс с инсультом адемолом, подобно цитиколину, способствовала гиперэкспрессии гена c-fos в сомато-сенсорной коре головного мозга в восстановительном периоде ОНМК (21 сутки). Так, количество c-fos-позитивных нейронов повысилось относительно интактных животных в среднем соответственно на 190,90% и 197,72% (табл.). При этом количество bcl-2-позитивных нейронов на фоне применения адемола достоверно не изменилось по сравнению с показателем 4-х суток церебральной ишемии, а в случае терапии референс-препаратом увеличилась более чем вдвое ( $p < 0,05$ ). Полученные данные указывают на то, что курсовая 21-дневная терапия крыс адемолом является основой для увеличения количества морфологически измененных нейронов в пенумбре. Во-первых, это может происходить за счет торможения в течение всего срока наблюдения неконтролируемой экспансии зоны тотальной ишемии, что является следствием «переключения» некротического типа смерти нервных клеток пенумбры на более благоприятный апоптотический; во-вторых, благодаря стабилизации увеличению синтеза в этой области антиапоптотического белка bcl-2. Последнее блокирует инициацию процессов нейроапоптоза и обеспечивает уменьшение его распространенности.

Модулирующее влияние цитиколина на реализацию нейроапоптоза проявилось преимущественно в восстановительном периоде церебральной ишемии. Следует отметить, что чрезмерная экспрессия гена c-fos в сомато-сенсорной коре головного мозга на 21-е сутки на фоне терапии крыс с ОНМК обоими веществами может способствовать более быстрому и полноценному восстановлению нарушенных при развитии ишемии процессов запоминания, обучения, а также регрессу неврологического дефицита. Полученные данные о модулирующем влиянии адемола на динамику процессов нейрональной смерти в разные периоды ОНМК позволяют отнести его преимущественно к первичным нейропротекторам.

#### **Выводы.**

1. Модель билатеральной каротидной окклюзии у крыс сопровождается преобладанием некротического типа гибели нейронов в очагах ишемии наряду с активацией процессов апоптоза в зоне пенумбры.

2. Оригинальное производное адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфолино-2-пропанола хлорид (условное название адемола) способствует угнетению процессов некротизации нейронов в очагах ишемии и трансформации морфологического типа клеточной смерти с некротического на более «мягкий» апоптотический, о чем свидетельствует повышение экспрессии генов раннего реагирования c-fos и bcl-2. Одновременно в зоне пенумбры имеет место угнетение явления апоптоза.

3. Корректирующее воздействие адемола на различные пути гибели нейронов в условиях ишемического инсульта может быть одним из механизмов его церебропротекторного действия.

#### **Литература**

1. Баринов, А. Н. Роль окислительного стресса в заболеваниях нервной системы – пути коррекции / А.Н. Баринов // Трудный пациент. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 10-13.
2. Беленичев, И.Ф. Роль гена раннего реагирования c-fos в норме и в нейродеструктивной токсической патологии. Возможности фармакокоррекции нейропептидными лекарственными средствами / И.Ф.Беленичев, Е.Л.Левицкий, С.В.Павлов // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – №1. – С. 17-27.
3. Залесский, В.Н. Методы ранней диагностики апоптоза *in vitro*, *in vivo* для оценки хронических токсикантов / В.Н.Залесский, Н.В.Великая // Совр. пробл. токсикол. – 2006. – № 1. – С. 78-82.
4. Кладова, Е.А. Оценка медиаторов воспаления при ишемическом инсульте / Е.А.Кладова, А.В.Соснина, Б.М.Доронин // Цитокины и воспаление. – 2011. – №4. – С. 20-26.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У.Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
6. 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.
7. Belenichev, I.F. Malate-aspartate shunt in neuronal adaptation to ischemic conditions: molecular-biochemical mechanisms of activation and regulation / I.F.Belenichev, Yu.M.Kolesnik, S.V.Pavlov // *Neurochemical Journal*. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 22-28.



8. Waring, P. Apoptosis or programmed cell death / P.Waring, F.J.Kos, A.Mullbacher // Med. Res. Rev. – 2008. – №11. – P.219-236.
9. Rohn, T.T. Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after over-expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 / T.T.Rohn, V.Vyas, T.Hernandez // J. Neurosci. – 2008. – Vol. 28. – P. 3051-3059.

## **MODULATION OF APOPTOSIS WITH ADEMOL UNDER CONDITION OF MODELING OF ACUTE DISORDER OF ENCEPHALIC CIRCULATION BY INFLUENCE ON EXPRESSION OF EARLY REACTING GENS**

**O.A. KHODAKOVSKIY<sup>1</sup>**  
**S.V. PAVLOV<sup>2</sup>**  
**N.V. BUCHTIYAROVA<sup>2</sup>**

<sup>1)</sup>*Pirogov Memorial Medical  
University, Vinnitsya, Ukraine*

<sup>2)</sup>*Zaporizhzhia State  
Medical University,  
Zaporizhzhia, Ukraine*

*e-mail: aleksey.hodakovskiy@bk.ru*

In experiments on the rats it was established that model of acute disorder of encephalic circulation (bilateral carotid occlusion) is accompanied by prevalence of necrosis type of neurons death in areas of ischemia as well as in area of ischemic half shadow by activation of apoptosis processes. Experimental therapy of rats with cerebral infarction by derivate of adamantan by 1-adamantiloxy-3-morfolino-2 propanol hydrochloride (under conventional name ademol) in dose 2mg/kg intraabdominal in treatment mode (in 1 hour after remodeling of insult and further in every 24 hours during 21 days) supplies depression of processes of necrosis of neuron cells in ischemic nidi and transformation of morphologic type of cell death from necrotic into more "soft" apoptotic. At the same time in area of penumbra have place depression of apoptosis which is manifested by increasing quantity of products of gens expression of c-fos and bcl-2. This corrective influence of ademol on types of death of neurons can be one of mechanisms of its cerebroprotective action

Keywords:ademol, cerebral ischemia, gens' expression, apoptosis.