

Васильев Ю.Г.¹, Берестов Д.С.¹, Вольхин И.А.¹,
Канунникова О.М.², Аксенова В.В.², Ладьянов В.И.²

УДК 547.022
DOI 10.25694/URMJ.2019.01.33

Влияние кристаллических модификаций пирацетама I и II на течение постишемических состояний после острой транзиторной билатеральной ишемии мозга

1 — ФБГБОУ ВО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия», Ижевск, 2 — Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН (УдмФИЦ УрО РАН), Ижевск

Vasilyev G.I., Berestov D.S., Volkhin O.M., Kanunnikova O.M., Aksenova V.V., Ladanov V.I.

Effect of crystal modifications of piracetam I and II on the flow post-ischemic states after acute transient bilateral cerebral ischemia

Резюме

Кристаллические модификации I и II пирацетама получены кристаллизацией из водных растворов с pH <7.1 и ≥7.1, соответственно. Механоактивация полученной модификации I приводит к полиморфному превращению в модификацию II. Обсуждаются различия структурного состояния молекул при растворении ПА модификации I и II, которые приводят к различному характеру гидролиза. Установлено различное влияние кристаллических модификаций I и II пирацетама на осмотическую резистентность эритроцитов человека и сохранность структур мозга крыс после транзиторной билатеральной окклюзии общих сонных артерий. Выявлено положительное влияние модификации II пирацетама в виде снижения смертности, уменьшения уровня экспрессии каспазы-3 и числа вакуолизованных нейронов в моторной коре больших полушарий крыс, в ходе реактивных ответов в острую фазу после транзиторной артериальной ишемии. **Ключевые слова:** пирацетам, кристаллические модификации, транзиторная артериальная ишемия, физико-химические свойства

Summary

Piracetam with crystalline type I and II was produced by crystallization from water solution with pH <7.1 and ≥7.1 relatively. Ball milling of obtained powder with crystalline type I has resulted in transformation into crystalline type II. The peculiarities of molecular structure of piracetam in solution, which generate the different hydrolysis nature, are discussed. The influence of the crystalline modifications I and II of piracetam on the osmotic magnetic-ical resistance of human erythrocytes and preservation of the structures of the brain of rats after transitorial bilateral occlusion of common carotid arteries was established. Revealed positive effect of the modification II of piracetam in the form of lower mortality, reduction express these caspase-3 vacuolization and the number of neurons in the motor cortex of rats, during reactive responses in the acute phase after transient arterial ischemia.

Key words: piracetam, crystal modifications, transient arterial ischemia, physical and chemical properties

Введение

История применения пирацетама как ноотропного препарата в клинике насчитывает уже почти четыре десятилетия [1, 2]. На сегодняшний день препараты пирацетама составляют более половины номенклатуры европейского рынка ноотропов, причем их перечень продолжает неуклонно расширяться. Высокая практическая востребованность пирацетама обусловила интерес к исследованию его структуры, биологических и физико-химических свойств [1- 8].

Клинические исследования влияния пирацетама

довольно многочисленны. Выявлено положительное влияние пирацетама при различных неврологических заболеваниях и перспективность расширения области его применения [8-11].

К настоящему времени известно пять кристаллических модификаций пирацетама [12-16]. При комнатной температуре и нормальном давлении наблюдается три модификации, две из них (I, III) имеют моноклинную решетку, а модификация II – триклинную. Высокотемпературная модификация I при комнатной температуре переходит в модификацию II [17, 18].

Известно, что образование различных полиморфных модификаций одного и того же лекарственного вещества происходит при замене растворителей, при введении в жидкие или мягкие лекарственные формы разных вспомогательных веществ, при сушке и т.д. Наличие полиморфной модификации важно, если вещество входит в твердые дозированные формы. В связи с этим необходимы исследования полиморфизма лекарственных субстанций, что позволит выбрать те полиморфные модификации, которые обладают высокой биодоступностью [19-23]. Следует отметить отсутствие сравнительных исследований эффективности действия пирacetama разных кристаллических модификаций.

Еще один важный вопрос, который возникает при исследовании свойств препаратов с разной кристаллической структурой, это вопрос сохранения различий структуры вещества в растворе. Поскольку растворение является необходимой стадией действия препарата на организм.

В данной работе были исследованы структурно-чувствительные и биологические свойства растворов пирacetama модификаций I и II.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся пирacetам («сч»). Уровень pH раствора снижали до 3.10, путём добавления в водный раствор уксусной кислоты. Раствором водного аммиака pH повышали до 10.96. Кристаллизация пирacetama из растворов проводилась при температуре $115 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Концентрация ацетата натрия в полученном пирacetаме определялась методом атомно эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (на спектрометре Spectroflame Modula S) и составляла 0.2 ± 0.0025 вес.%. Механоактивация пирacetama проводилась в шаровой планетарной мельнице АГО-2С (Россия) (600 об/мин) в среде аргона в течение 30 мин. Энергонапряженность мельницы составляла 2 кДж/г.

Рентгенофазовый анализ (РФА) порошков пирacetama проведен на дифрактометре Bruker D8 Advance (Германия) с использованием $\text{CuK}\alpha$ излучения. Обработка дифракционных данных и уточнение структуры методом Ритвельда проведены с использованием TOPAS 4.2 в варианте WPPF (whole-powder pattern fitting). Инструментальный вклад в профиль дифракционных линий учитывали с использованием эталона MgO [24]. ИК-спектры получены на ИК Фурье спектрометре ФСМ 1202 (Россия).

Истинную плотность полученных порошков пирacetama определялась пикнометрическим методом. В качестве вспомогательной жидкости использовали н-гептан. Определение pH водных растворов пирacetama проводилось на pH-метре МУЛЬТИТЕСТ ИПЛ-301 (Россия). Ошибка определения составляла ± 0.01 . Капиллярная вязкость водных растворов измерялась с помощью вискозиметра ВПДЖ-2 с диаметром капилляра 0.37 мм. Ошибка измерения составляла $\pm 1\%$. Плотность растворов определяли с помощью пикнометра Оствальда объемом 0.9436 мл. Ошибка измерения составляла $\pm 0.3\%$.

Объектами исследования биологического влияния пирacetama служили половозрелые белые лабораторные крысы – самцы линии “Wistar”. Исследование осуществлялось строго в соответствии с правилами проведения работ с экспериментальными животными.

Осмотическую резистентность эритроцитов на в различных растворах пирacetama исследовалась на образцах крови 5 людей, отобранных из вены натощак. При этом в вакуумные пробирки с ЭДТА объемом 5 мл добавляли 0.25 мл 2%-ых растворов обеих форм пирacetama на физиологическом растворе. В качестве контроля в кровь добавляли эквивалентное количество физиологического раствора.

Для исследования динамики неврологических изменений согласно рекомендованному перечню исследований [28] использовано 234 крысы (возраст 6 месяцев постнатального онтогенеза, масса 180-200 г) на 3, 7, 14 сутки после 30-ти минутной транзитной билатеральной окклюзии общих сонных артерий под золетилловым наркозом. Контрольным животным, аналогичная процедура проводилась без дополнительных лечебных манипуляций. В первой опытной группе вводили раствор пирacetama кристаллической модификации I, второй группе – раствор модификации II в аналогичных дозировках. В течение первых 3 суток раствор применяли внутримышечное введение препаратов в область бедра в дозе 300 мг/кг в сутки. В последующие сроки в течение всего времени наблюдения использовалось однократное ежедневное пероральное введение в тех же суточных дозах.

Для определения неврологического статуса животных за основу была взята модифицированная нами комплексная оценка общих и очаговых неврологических расстройств высших млекопитающих [29], построенная на основе рекомендаций Т.А. Ворониной [30], с полуколичественной оценкой чувствительности, силы и амплитуды мышечных сокращений, экстрапирамидных расстройств.

Забой животных для морфологических исследований осуществляли под золетилловым наркозом методом декапитации. Структурные перестройки мозга исследовали с помощью гистологических (окрашенных гематоксилином и эозином, по Нисслю, импрегнированных по Гольджи в модификации Бюбенета, иммуногистохимических методов. Изучали экспрессию Каспазы-3 непрямым иммунопероксидазным методом на парафиновых срезах. При этом использовали моноклональные антитела: Rabbit Caspase-3 Monoclonal Antibody (clone CPP32).

Результаты и обсуждение

Получение и физико-химические свойства модификаций пирacetama I и II. Порошок пирacetama, полученный из раствора с pH 5.7, представляет собой кристаллическую модификацию I (моноклинная решетка, пространственная группа $P2_1/n$), кристаллографические параметры которой хорошо согласуются с параметрами чистого пирacetama [13]. В отличие от модификации I чистого пирacetama исследованной в [12, 15] полученная нами модификация I остается стабильной достаточно долго: повторный РФА анализ этого же образца, прове-

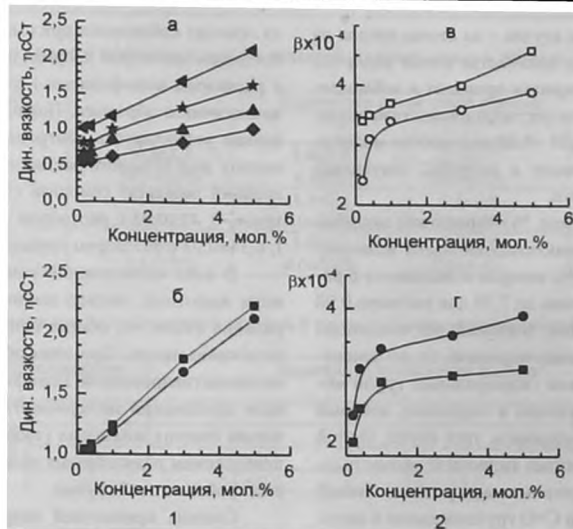


Рис. 1- Концентрационная зависимость динамической вязкости растворов: (а) - пирacetам модификации II от температуры: ◀-20°C, □ -30°C, ▲-40°C, ~ 50°C; (б) модификаций I (■) и II (●) при 20°C; 2- концентрационная зависимость температурного коэффициента объемного расширения растворов: (в) - пирacetам модификации II от температуры: ○-20-30°C, □ - 20-50°C; (г) модификаций I (■) и II (●) при 20°C.

денный через 6 месяцев, показал, что структура модификации I не изменилась. Для сравнения, модификация I, полученная нагревом модификации II (реактив марки «хч»), трансформировалась в модификацию II через несколько часов. Повышение pH раствора до 7.1–10.96 при кристаллизации приводит к образованию пирacetам модификации II (триклинная решетка, пространственная группа, P-1).

РФА данные показывают, что уже после 10 мин. механоактивации модификация I превращается в модификацию II. Увеличение времени механоактивации до 30 мин. не приводит к другим полиморфным превращениям. Механоактивации порошка модификации II, полученного кристаллизацией из раствора не изменяет его кристаллическую структуру. Полученные в данной работе кристаллографические параметры порошков пирacetам модификации II хорошо согласуются с параметрами, приведенными в работах [13, 14, 15, 16], для пирacetам модификации II полученной другими методами.

В ИК спектре пирacetам модификации II, полученной механоактивацией, по сравнению с пирacetамом модификации I наблюдаются незначительные изменения в области деформационных C-N колебаний гетероцикла (1050-1100 см⁻¹) и уширение (на 30%) полос поглощения в области спектра 1600-1800 см⁻¹, соответствующей валентным колебаниям C=O гетероцикла и C=O амида. Причиной этих эффектов может быть формирование в механоактивированной модификации II различных надмолекулярных структур.

Растворимость модификаций пирacetам I и II, полученных кристаллизацией из растворов, в дистиллированной воде (pH=6.7) составляет 72.5±0.15 г/100г H₂O/ Скорость растворения пирacetам модификаций I и II, полученных кристаллизацией, одинакова. Меха-

ноактивация приводит к незначительному уменьшению растворимости (до 71.6±0.15 г/100г H₂O) и повышению скорости растворения (в ~ 1.5 раза). Анализ ИК-спектров свидетельствует, что все исследованные водные растворы пирacetам стабильны не менее 36 ч, затем происходит гидролиз пирacetам.

Структурно-чувствительные свойства растворов пирacetам модификаций I и II в дистиллированной воде были исследованы с целью выяснения, сохраняется ли различие структурного состояния молекул пирacetам модификаций I и II при растворении, или при взаимодействии с водой эти различия исчезают. На рис. 1-1а и 1-2а приведены концентрационные зависимости динамической вязкости и температурного коэффициента объемного расширения растворов модификации II при различных температурах. Для растворов модификации I характер зависимостей практически такой же. Динамическая вязкость водных растворов пирacetам модификации II несколько ниже, чем модификации I (рис. 1-1б). Для растворов модификации I и II (7.4 мол. %) избыточная плотность (при 25°C) составляет 0.0871 и 0.0789 г/см³, соответственно. Все эти различия свидетельствует о повышении гидрофобности молекулы пирacetам механоактивированной модификации II. Уменьшение доли связанных молекул воды подтверждается повышением температурного коэффициента объемного расширения: 4.5·10⁻⁴ и 5.1·10⁻⁴ для растворов пирacetам модификации I и II, соответственно.

Величина pH растворов пирacetам модификации I и II (0.98 мол. %), полученных кристаллизацией из растворов с различными pH, практически одинакова: 5.90 и 5.98 соответственно.

Пирacetам, как и все амиды, является слабой NH-кислотой, атомы водорода NH₂ группы могут замещаться

на атомы металла, в данном случае – на атомы натрия из ацетата натрия. Увеличение количества ионов водорода в растворе с ростом концентрации приводит к наблюдаемому понижению рН водного раствора пирacetама модификации I. Для раствора с рН =5.89 количество молекул пирacetама, прореагировавших с натрием, составляет величину порядка 10–6 моль/л.

Водный раствор (0.39 мол. %) пирacetама модификации II, полученной механоактивацией, имеет величину рН нейтральной среды (6.66), которая повышается с ростом концентрации пирacetама до 7.59 для раствора 0.98 мол. %. Различное поведение значений рН свидетельствует об изменении механизма гидролиза, т.е. об изменении характера взаимодействия гидрофильных групп молекулы пирacetама, участвующих в гидролизе, который определяется зарядовым состоянием этих групп. Одной из причин изменения механизма гидролиза может быть образование внутримолекулярных водородных связей между NH₂-группой амида и С=О группой амина в молекуле модификации II вследствие благоприятных стерических условий, возникающих при механоактивации. В результате изменяется эффективный заряд на NH₂-группе и кислотные свойства подавляются. В пользу предположения о формировании внутримолекулярной водородной связи свидетельствует незначительное уменьшение растворимости механоактивированной модификации II по сравнению с модификацией, полученной кристаллизацией из раствора. Возможность формирования такой связи показана в работе [25]: в молекуле модификации I внутримолекулярная водородная связь образуется при быстрой кристаллизации, а в молекуле модификации II – при медленной кристаллизации. На основании вышеизложенных результатов (анализ рН и растворимости) можно предположить, что при механоактивации создаются более благоприятные условия для формирования внутримолекулярной связи по сравнению с кристаллизацией.

Еще одной возможной причиной подавления гидролиза может быть таутомерное превращение – переход атома водорода от NH₂ группы к ближайшей С=О группе, в результате чего понижается гидрофильность обеих групп. Если предположить, что одна гидроксильная группа появляется в результате взаимодействия с водой одной молекулы пирacetама, то в растворе 0.98 мол. % в таком взаимодействии участвует порядка 10–7 молекул, т.е. количество таутомеров или молекул пирacetама модификации II с внутримолекулярной связью чрезвычайно мало.

Структура, сформированная при механоактивации, сохраняется в течение 4 месяцев. Далее свойства механоактивированной модификации становятся такими же как свойства модификации, полученной кристаллизацией из раствора.

Экспериментальные биологические исследования. Одним из предполагаемых механизмов ноотропного действия пирacetама является его влияние на эластические свойства биологических мембран [16]. В связи с этим, свойства пирacetама оценивались *in vitro* на основании исследований осмотической резистентности эритроцитов крови человека. У контрольных образцов в 3 случа-

ях гемолиз наблюдался при смешивании образца крови с 0.4%-ным раствором хлорида натрия. Смешивание крови с раствором модификации I давало тот же результат по аналогичным образцам. Пирacetам модификации II повышал устойчивость эритроцитов к осмотическому гемолизу до 0.35%-ного раствора хлорида натрия. В целом средний результат гемолиза составил 0.42±0.04, в контроле, 0, 41±0.05 с раствором пирacetама модификации I, 0,34±0.03 с раствором пирacetама модификации II.

В ходе исследований влияния ноотропов на организм животных, подвергавшихся транзиторной билатеральной окклюзии общих сонных артерий, определяли их выживаемость. При этом обнаружено, что коррекция механоактивированной модификацией II пирacetама на всем протяжении эксперимента ведет к снижению количества павших животных (табл. 1). Это сопровождалось повышением разнообразия проявлений неврологических расстройств в этой группе.

Степень проявлений неврологических нарушений оценивалась по балльной системе методом полукваликативной оценки. При этом суммация степени нарушений интерпретировалась следующим образом: 0 баллов – неврологических нарушений нет, 1-5 баллов – незначительные неврологические дефициты или отдельные очаговые повреждения мозга. Уровень повреждений с 6 до 8 баллов рассматривалось как умеренное повреждение мозга, а 9-12 баллов как значительные диффузные или очаговые неврологические расстройства (табл. 2).

До ишемии во всех исследованных группах у животных отсутствовали или имели место весьма незначительные неврологические расстройства не более 1 балла. На 3 сутки после транзиторной ишемии неврологический дефицит выявлен во всех рассматриваемых группах и у каждого выжившего животного. Он колебался в пределах 5-11 баллов и в основном соответствовал умеренной степени повреждения. К 14 суткам проявления неврологического дефицита нивелируются до преимущественно легких неврологических расстройств, что вероятно, связано с редукцией защитно-охранительного торможения в зоне пенумбры. Во второй опытной группе при этом выявляется большая группа животных с легкими нарушениями, но в ней же чаще выявляются и более выраженные функциональные расстройства. Во 2 опытной 3 крысы проявляли нарушения на уровне 9-11 баллов. Это коррелирует с повышением выживаемости крыс с недостаточностью сосудистых анастомозов Велизиева круга, и соответственно ведет к высокому уровню разнообразия рассматриваемых неврологических нарушений. При этом инволюция нарушений при менее существенных начальных повреждениях под влиянием пирacetама модификации II происходит быстрее, чем в контроле и первой опытной группе.

У выживших животных всех сроков наблюдения не выявлено крупноочаговых зон некрозов, что косвенно указывало на поддержание коллатерального кровообращения. Однако во всех случаях выявлялись диффузные и мелкоочаговые поражения. Наиболее выражены они в передних корковых отделах коры. У контрольных живот-

Таблица 1. Среднее число и относительное количество павших крыс в разные сроки эксперимента

Группы животных	Количество суток после ишемии			
	1	3	7	14
Контроль	10.8±1.1	5.4±0.4	5.5±0.7	4.4±0.2
	14.6±1.5%	6.6±%	6.6±0.8%	5.3±0.2%
I группа	9.3±0.9	3.3±0.5	3.4±0.8	2.2±0.2
	12.0±1.2%	4.0±0.5%	4.0±0.9%	2.6±0.2%
II группа	6.8±0.7	3.1±0.3	2.2±0.5	1.2±0.2
	9.3±0.9%	4.0±0.4%	2.6±0.6%	1.3±0.2%

Таблица 2. Оценка неврологического статуса в разные сроки эксперимента крыс (в баллах)

Группы животных	До воздействия	Количество суток после ишемии				
		3	7	14		
Контроль	баллы	0	7.3 ± 0.4	5.6 ± 0.4	3.1 ± 0.5	
		I группа	0	7.0 ± 0.5	5.3 ± 0.2	3.5 ± 0.8
		II группа	0	7.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	2.8 ± 0.8

Таблица 3. Относительное содержание различных форм нейронов (%) во II слое моторной коры БП

Кол-во суток после ишемии	Группы животных	Морфологически не измененные нейроны	Гиперхромные, сморщенные нейроны	Вакуолизованные нейроны	Гипертрофированные нейроны
3 суток	Контроль	24.8 ± 2.2	14.4 ± 1.9	59.5 ± 3.1	1.3 ± 0.5
	Опыт 1	29.7 ± 1.8	17.1 ± 1.4	50.3 ± 2.2	2.9 ± 0.6
	Опыт 2	36.1 ± 1.9 **	24.6 ± 2.1 *	38.5 ± 1.6 ***(**)	0.8 ± 0.2
7 суток	Контроль	8.9 ± 1.6	11.4 ± 1.3	79.1 ± 2.4	0.6 ± 0.2
	Опыт 1	14.3 ± 1.7	18.3 ± 1.5*	63.9 ± 2.2 **	3.5 ± 0.3 ***
	Опыт 2	28.4 ± 1.5***	12.8 ± 1.6	57.4 ± 1.8 ***	1.4 ± 0.1*(*)
14 суток	Ложнооперированные	89.4 ± 1.7	7.3 ± 0.8	2.5 ± 0.3	0.8 ± 0.3
	Контроль	27.2 ± 2.9	17.7 ± 1.4	48.3 ± 2.5	6.8 ± 0.9
	Опыт 1	31.8 ± 2.3	19.0 ± 1.8	45.4 ± 1.9	3.8 ± 0.4 *
	Опыт 2	39.5 ± 1.7 *	19.1 ± 2.0	29.1 ± 2.1 **(*)	12.3 ± 1.4 *(**)

Достоверность в этой и приведенных ниже таблицах:

- * - разница результатов достоверна по сравнению с контрольными животными с $p < 0.05$
- ** - разница результатов достоверна по сравнению с контрольными животными с $p < 0.01$
- *** - разница результатов достоверна по сравнению с контрольными животными с $p < 0.001$
- (*) - разница результатов достоверна по сравнению с животными опыта 1 $p < 0.05$
- (**) - разница результатов достоверна по сравнению с опыта 2 $p < 0.01$
- (***) - разница результатов достоверна по сравнению с опыта 2 $p < 0.001$

Таблица 4. Содержание клеток, экспрессирующих каспазу-3 (клеток в поле зрения) в V слое моторной коры БП

Кол-во суток после операции	Контрольная группа	Опыт 1	Опыт 2	Ложнооперированные животные
3 суток	7.3 ± 0.6	9.2 ± 0.7	5.8 ± 0.4	-
7 суток	11.4 ± 0.4	9.7 ± 0.8*	7.3 ± 0.3 ***	-
14 суток	8.3 ± 0.4	7.6 ± 0.7 *(*)	3.4 ± 0.9 ***(***)	0.6 ± 0.1

ных и в первой опытной группе на 3 сутки эксперимента изменения были близки. В поверхностных слоях коры в первой опытной группе динамика была связана с резким увеличением числа вакуолизованных нейронов во II слое коры (50.3 ± 2.2% от всей популяции), что однако было несколько менее выражено в сравнении с контролем ($p < 0.05$). Число гиперхромных нейронов было невелико и не имело значимой динамики по сравнению с контрольной группой. Введение механоактивированной модифи-

кации II пиратама вело к снижению числа нейронов с признаками вакуолизации до 38.5 ± 1.6 % с $p < 0.001$. Аналогичный показатель в контрольной группе составил 59.5 ± 3.1 %. Кроме того, значительно снизилось число измененных клеток. Однако количество нейронов с проявлениями сморщивания сомы сохранилось на исходном уровне. Значительно увеличилось количество клеток без признаков выраженных реактивных ответов перикариона – до 36.1 ± 1.9 % ($p < 0.01$) по сравнению с контролем

24.8 ± 2.2 % и первой опытной группой 29.7 ± 1.8 % (табл. 3).

На 7 сутки от начала эксперимента ответы моторной коры наблюдались как в виде диффузных, так и мелкоочаговых зональных реакций. В молекулярном, наружном зернистом и наружном пирамидном слоях нейроны демонстрировали признаки набухания и вакуолизации цитоплазмы. Во втором слое доля клеток с подобными изменениями достигала 79.1 ± 2.4 %, в некоторых случаях идентифицировались признаки кариолизиса. Обнаруживались признаки нейронафагии в местах гибели нервных клеток. В первой опытной группе по сравнению с контролем достоверно возрастала доля гипертрофированных нейронов – соответственно с 0.6 ± 0.2 до 3.5 ± 0.3 % (p<0.001). Клетки с признаками сморщивания ядра и сомы в целом в основном проявлялись в III слое. В более глубоких цитоархитектонических слоях преобладали процессы сморщивания, а не набухания и вакуолизации, что может быть косвенным свидетельством доминирования процессов программируемой клеточной гибели над аутолизом.

В опытных группах по сравнению с контролем реакции нейронов поверхностных слоев коры БП близки. Содержание вакуолизированных нейронов во II слое снижалось до 63.9 ± 2.2 % (p<0.01) в первой опытной группе и до 57.4 ± 1.8 % (p<0.001) во второй. Применение механоактивированной модификации II пираретама во второй опытной группе приводило к менее выраженным морфологическим ответам во всех слоях исследуемых полей коры БП.

На 14 сутки эксперимента наиболее значимые морфологические ответы на гипоксию наблюдались в поверхностных слоях коры. В наружном зернистом слое выявлялось множество нейронов с признаками вакуолизации цитоплазмы и просветления ядра (48.3 ± 2.5 % от общей численности нейронов слоя). В первой опытной группе этот показатель снижался до 45.4 ± 1.9 %, а во второй до 29.1 ± 2.1 % (p<0.01). Удельная плотность нейронов в контроле при этом была равна 41.0 %. Аналогичный показатель внутреннего пирамидного слоя составил 18.6 %. Обнаруживалось большое количество гиперхромных нейронов с темными ядрами. В глубже расположенных слоях морфологические ответы были менее выраженными и в основном проявлялись пикнотическими изменениями. Доля подобных клеток в контроле составила 18.4 ± 1.7 %, в первой опытной группе 16.9 ± 1.2 % и во второй опытной группе 14.1 ± 1.1 %. Набухание и вакуолизация цитоплазмы однако все еще составляли достаточно существенный процент от общей численности нервных клеток – 19.8 ± 2.1 % в контроле со снижением до 14.5 ± 1.0 % в первой опытной группе, и до 8.4 ± 0.9 % (p<0.01), во второй. Признаки нейронафагии выявлялись во всех слоях моторной коры БП, но имели диффузное распределение. В отдельных зонах коры БП (лобная и в меньшей степени соматосенсорная кора) идентифицировались небольшие участки с признаками некроза и миграции микро и макроглии в соседствующих участках, имеющих линейные размеры до 100-300 мкм. Во второй опытной группе во

II и V слоях коры количество поврежденных нейронов было существенно меньше в основном за счет сокращения количества вакуолизированных клеток, доля которых во втором слое составляла существенно меньшее число в сравнении с предыдущим сроком исследования – 29.1 ± 2.1 % (p<0.01).

Известно, что набухание и вакуолизация клеток являются морфологическими проявлениями происходящего аутолиза, а сморщивание тела и ядра с последующим кариорексисом может быть проявлением программируемой клеточной гибели, однако для доказательства последнего необходимо выявление специфических маркеров апоптоза. В связи с этим дополнительно было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии каспазы-3 в рассматриваемых зонах мозга.

Выявляемость каспазы-3 к 3 суткам эксперимента во внутреннем пирамидном слое моторной коры в опытных группах была существенно выше по сравнению с ложнооперированными животными (p<0.001). Во второй опытной группе наблюдалась тенденция к снижению этого показателя, а к 7 и 14 суткам эксперимента разница становилась достоверно значимой. При этом численность каспаза-3-позитивных нейронов была практически в 2 раза ниже в сравнении с контролем и крысами, получившими модификацию I пираретама. В той же группе уменьшалось количество клеток с высокой экспрессией маркера. Во всех группах животных распределение каспаза-3-позитивных нейронов носило диффузный характер. Иногда обнаруживалась тенденция к формированию групп их нескольких клеток в поверхностных слоях коры у животных, перенесших ишемию.

Эффекты от введения пираретама модификации II, кристаллизованного из раствора, и модификации II спустя 4 месяца от механоактивации были сходны с действием модификации I.

Полученные наблюдения демонстрируют, что введение механоактивированной модификации II возможно оказывает мембранопротективный эффект за счет которого можно объяснить повышение осмотической резистентности эритроцитов. Вероятно, подобное действие в отношении нейронов позволяет повысить их сохранность при инициации аутолиза после перенесенной ишемии, а меньшая численность погибших нервных клеток автоматически объясняет снижение морфологических проявлений признаков глиоза.

Согласно литературным данным, именно воздействием на мембрану объясняются эффекты пираретама, хотя механизмы его действия до сих пор во многом остаются спорными [27, 31, 32, 33]. В соответствии с «мембранной» гипотезой молекулы пираретама взаимодействуют с мембранными фосфолипидами с образованием подвижных молекулярных комплексов, которые могут вызывать реорганизацию липидов и повышать прочностные характеристики мембран клетки [34]. Возможно, что именно изменение эластичности цитолеммы является ключом к пониманию механизмов биологических эффектов пираретама.

Уменьшение гидрофильности обычно сопровожда-

ется возрастанием растворимости в липидах, что теоретически должно облегчать взаимодействие пирacetама модификации II, имеющего внутримолекулярную водородную связь с липидным компонентом биологической мембраны. Вероятно этот эффект, возникающий при механоактивации пирacetама, объясняется таутомерным превращением его молекулы. Подобное изменение биологических свойств молекулы было показано нами ранее в отношении оротата магния, биологическая активность гидроксид-формы которого повышалась по сравнению с оксо- и дигидроксид- формами. Механизмом эффекта при этом стало присутствие кислородсодержащих функциональных групп одного сорта (ОН- или С=О).

Заключение

Проведенные исследования показывают, что кристаллические модификации пирacetама I и II сходным образом воздействуют на характер течения процессов в нейронах после острой транзиторной билатеральной ишемии мозга. Вероятной причиной увеличения эффективности механоактивированной модификации II явля-

ются особенности стерического расположения функциональных групп С=О и -NH₂ или(и) изменение состава этих групп (образование С-ОН и =NH) за счет образования внутримолекулярной водородной связи или таутомерного превращения молекулы пирacetама. Для обоснования различных механизмов действия исследованных форм пирacetама с мембранами клеток требуются прямые исследования биологических мембран. ■

Авторы выражают благодарность Мухгалину В.В. за проведение рентгеноструктурного анализа и к.ф.-м.н. Михайловой С.С. за участие в обсуждении результатов физико-химических экспериментов.

Васильев Ю.Г., Берестов Д.С., Вальхин И.А., Канунникова О.М., Аксенова В.В., Ладьянов В.И., ФБГБОУ ВО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия», Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН (УдмФИЦ УрО РАН), Ижевск

Литература:

1. Аведисова А.С., Ахапкин Р.В., Ахапкина В.И. и др. Анализ зарубежных исследований ноотропных препаратов (на примере пирacetама). *Росс. психиатр. журнал.* 2001, 1: 46-54.
2. Востриков В.В. Место пирacetама в современной практической медицине. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2017, 1:14-25.
3. Maher A., Crocer D., Rasmusen A.C., Hodnett B.V. Solubility of metastable polymorph piracetam in a range of solvents. *J.Chem. Eng. Data.* 2010, 55: 5314-5318.
4. Maher A. *Crystall transformation and crystallization methodologies: polymorphic transformation of piracetam.* Ph. D Thesis, Limeric, Ireland. 2013.
5. Winblad B., Piracetam: a review of pharmacological properties and clinic uses. *CNS Drug Reviews.* 2005, 11: 169-182.
6. Evans J.G., Wilcock G., Birks J. Evidence-based pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2004, 7: 351-369.
7. Gualtieri F., Manetti D., Romanelli M. N., Ghelardini C. Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs. *Curr. Pharm. Des.* 2002, 8: 125-138.
8. Malykh A.G., Reza Sadaie M. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs.* 2010, 70(3): 287-312.
9. Воробьева О.В. Ноотропные препараты – новые возможности известных лекарств *Consilium Medicum (Ревматология и неврология).* 2008, 10(2): 7-11.
10. Путилина М.В. Современные представления о ноотропных препаратах. *Лечащий врач: Журнал для практикующего врача.* 2006, 5: 10-14.
11. Сычев Д.А., Герасимова К.В., Отделенов В.А. Пирacetам и пирacetамоподобные препараты: взгляд клинического фармаколога *Русский медицинский журнал: Независимое издание для практикующих врачей.* 2011, 19(15): 957-962.
12. Fabbiani F.P.A., Allan D.R., Parsons S. et.al., An exploration of the polymorphism of piracetam using high pressure. *Cryst. Eng. Comm.* 2005, 7: 179-186.
13. Louer D., Louer M., Dzyabchenko V.A et.al., Structure of a metastable phase of piracetam from X-ray powder diffraction using the atom-atom potential method. *Acta Crystallogr. B.* 1995, 51:182-187.
14. Admiraal G., Eikelenboom J.C., Vos A., Structures of the triclinic and monoclinic modifications of (2-oxo-1-pyrrolidinyl) acetamid. *Acta Crystallogr. B.* 1982, 38: 2600-2605.
15. Fabbiani F.P.A., Allan D.R., David W.I.F. et.al. High-pressure studies of pharmaceuticals: an exploration of the behavior of piracetam. *Cryst. Growth Design.* 2007, 7: 1115-1124.
16. Galdecki Z., Glowka M.L. Crystal-structure of nootropic agent, piracetam-2-oxopyrrolidin-1-ylacetamide. *Pol. J. Chem.* N1983, 57: 1307-1312.
17. Ceolin R., Agafonov V., Louër D., et al, Phenomenology of polymorphism. 3. p,T diagram and stability of piracetam polymorphs. *J. Solid State Chem.* 1996, 122: 186-194.
18. Kazantsev A. *Molecular Flexibility in Crystal Structure Prediction Ph. D Thesis, London, UK,* 2011.
19. Рудакова И.П., Ильина И.Г., Скачилова С.Я. и др.

- Полиморфизм и свойства лекарственных средств. Фармация. 2009, 8: 42–44.
20. Тенцова А. И. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств. Фармация. 1978, 3: 70–74.
 21. Brittain H.G. Polymorphism and solvatomorphism. *J. Pharm. Sci.* 2007, 96:705–728.
 22. Brittain H.G. Polymorphism and solvatomorphism. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97: 3611–3636.
 23. Гильдеева Г.Н., Гуранда Д.Ф. Получение полиморфных модификаций лекарственных веществ (Обзор). Вестник РГМУ. 2009, 6: 74–79.
 24. Pratapa S., O'Connor B. Development of MgO ceramics standards for x-ray and neutron line broadening assessments. *Advances in X-ray Analysis.* 2002. 45: 41–47.
 25. Braga D., Grepioni F., Lampronti G. I. et al. Ionic co-crystals of organic molecules with metal halides: a new prospect in the solid formulation of active pharmaceutical ingredients. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11: 5621–5627.
 27. Бурчинский С.Г. Ноотропная и вазотропная фармакотерапия в неврологии: сочетание препаратов или сочетанный эффект? Сучасні і та технології, МЛ. 2013, 1(97): 35–40.
 28. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая М.: Гриф и К. 2012.
 29. Васильев Ю.Г., Вольхин И.А. и др. Оценка неврологического статуса домашних и лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии.* 2013. № 3. С. 52–55.
 30. Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н. Экспериментальное изучение препаратов с противопаркинсонской активностью. *Ведомости НЦ ЭГКЛС.* 1999, 1.
 31. Mondadore C., Behavioral C. The pharmacology of the nootropics; new insights and new questions. *Brain Research.* 1993, 59: 1–9.
 32. Ковалев Г.И., Ахапкина В.И., Абаимов Д.А., Фирстова Ю.Ю. Фенотропил как рецепторный модулятор синаптической нейротрансмиссии. *Нервные болезни.* 2007, 4:1–4.
 33. Абдулина О.В. Пирацетам: от механизма действия к лечению когнитивных расстройств. *Русский медицинский журнал.* 2010, 18(26): 1596–1601.
 34. Peuvot J., Schanck A., Deleers M., Brasseur R. Piracetam-induced changes to membrane physical properties. A combined approach by ³¹P nuclear magnetic resonance and conformational analysis. *Biochem. Pharmacol.* 1995, 50: 1129–1134.