

УДК 615.356.577.164.15

О. В. Денисенко, О. А. Шандра, Л. М. Карпов

ЕФЕКТИ ВВЕДЕННЯ ІЗОПІКАМІЛОНУ ТА ПІКАМІЛОНУ В УМОВАХ ФОРМУВАННЯ ПІКРОТОКСИН-ІНДУКОВАНОЇ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОЇ АКТИВНОСТІ У ЩУРІВ

Вивчався вплив системного введення ізопікамилону (ІП) і пікамилону (П) на динаміку частоти та тривалості пікротоксин-індукованої генералізованої активності лобної кори, медіодорсального таламуса й вентрального гіпокампа. У перші 5–10 хв після введення ІП і П дозою 50 мг/кг відбувалося різке посилення генералізованої активності. Максимальне збільшення інтенсивності судом на фоні значного зростання частоти і тривалості епілептиформних судомних розрядів зареєстрували після введення ІП. Показали неефективність використання П і, особливо, ІП як протисудомних препаратів під час вираженої генерації генералізованих спайк-хвильових розрядів. У 17,5 % випадків формування генералізованої ЕпА супроводжувалося розвитком окремих спайків. Після введення П не відбувалось їхнього пригнічення. На фоні збільшення частоти генерації спайків судомні прояви обмежувалися клонусами м'язів голови та передньої частини тулуба.

Ключові слова: генералізована епілептиформна активність, судоми, ізопікамилон, пікамилон.

UDC 615.356.577.164.15

O. V. Denysenko, O. A. Shandra, L. M. Karpov

EFFECTS OF ISOPICAMILON AND PICAMILON UNDER FORMATION OF THE PICROTOXIN-INDUCED GENERALIZED ACTIVITY IN RATS

Effects of systemic administration of isopicamilon (IP) and picamilon (P) on the frequency and duration of the picrotoxin-induced generalized activity in the rat's frontal cortex, medio-dorsal thalamus and ventral hippocampus were investigated. IP and P in dose of 50 mg/kg increased generalized activity during first 5–10 minutes after their administration. The maximum intensity of seizures with significant increasing frequency and duration of epileptiform convulsive discharges were registered after injection of IP. It was shown that P and, especially, IP didn't reveal anticonvulsive effects in the model of generalized spike-wave discharges. The generation of cortical individual spikes was observed in 17.5% rats during the formation of the generalized epileptiform activity. The depression of spikes wasn't observed after injection of P. The increasing of the spike's frequency was accompanied only with ear and facial twitching and myoclonic contractions of body.

Key words: generalized epileptiform activity, seizures, isopicamilon, picamilon.

УДК 615.214:616.831:543.272.32:616.379-008.64-092.9

В. І. Жилюк, канд. мед. наук, доц.,

В. Й. Мамчур, д-р мед. наук, проф.

ВПЛИВ НООТРОПНИХ ЗАСОБІВ НА АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ВМІСТ НІТРОТИРОЗИНУ В КОРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ ТРИВАЛОЮ АЛОКСАН-ІНДУКОВАНОЮ ГІПЕРГЛІКЕМІЄЮ

ДУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Сьогодні відомо, що оксид азоту (NO) відіграє роль медіатора міжклітинної взаємодії, завдяки чому бере участь у регуляції численних функцій організму, у тому числі у ЦНС [1; 2]. NO-продукуючі клітини (нейрони, глія) широко розповсюджені в утвореннях головного та спинного мозку. Зокрема, висока питома активність нейрональної NO-синтази (nNOS) виявлена в кошикових клітинах мозочка та пірамідальних нейронних полях СА-1 зони гіпокампа, а також у хвостатому ядрі, мигдалику та ін. [2–4]. Значення NO в ЦНС може бути пов'язане з трьома процесами: участю в міжнейронному зв'язку як нейромедіатора, причому основна роль NO полягає в си-

наптичній пластичності; регуляції церебрального кровотоку та у встановленні міжнейронних синаптичних зв'язків під час розвитку нервової системи [4].

Передбачається, що NO бере регуляторну участь у процесах навчання та в механізмах пам'яті і це може мати важливе значення під час початкового набуття навичок [3; 4; 7]. Одне з імовірних підтверджень участі NO в механізмах пам'яті та синаптичній пластичності — збільшення тривалого синаптичного потенціювання у гіпокампі [3; 4]. Гіпокамп, як відомо, є морфологічною структурою ЦНС, яка спільно з корою великих півкуль відповідає за пам'ять [3].

Один із найпоширеніших патологічних станів, який трап-

ляється у людини та є причиною гострих і хронічних порушень мозкового кровообігу, — це цукровий діабет. Його перебіг призводить до виникнення синдрому хронічної цереброваскулярної недостатності, що супроводжується порушеннями когнітивних функцій, які можуть лежати в основі розвитку деменції [5; 6]. Експериментально встановлено, що перебіг стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів супроводжується дефіцитом тривалого потенціювання у гіпокампі, порушенням процесів навчання та змінами нейрональної експресії NO-синтази [7].

Серед інструментів фармакологічної профілактики та корекції порушених когнітивних

функцій найбільш вагомим є використання ноотропів, які належать до групи лікарських засобів, що здатні активізувати інтегративну функцію мозку, чинити стимулювальний вплив на процеси навчання, покращувати пам'ять і розумові здібності, а також підвищувати стійкість мозку до впливу негативних чинників [8].

Мета роботи — встановити вплив препаратів ноотропної терапії на функціонування системи оксиду азоту у тканинах головного мозку щурів з алоксановим діабетом (АД).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені на 120 білих щурах-самцях масою 250–300 г, які утримувалися на стандартному раціоні віварію (температура повітря (22 ± 2) °С, світлий/темний цикл — 12/12 год). Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату (Sigma, США) дозою 150 мг/кг у вигляді 5%-го розчину в ацетатному буфері, рН 4,5 після попередньої 24-годинної депривації їжі (при збереженому доступі до води) [8; 9]. Для зменшення загибелі тварин унаслідок гіпоглікемічного шоку після введення алоксану щури протягом 24 год після індукції діабету замість води отримували 5%-й розчин глюкози.

Рівень глюкози крові визначався на 11-ту добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbott Diabetes Care Inc., США). Для подальших досліджень використані тільки тварини з гіперглікемією (> 11 ммоль/л) [9; 10].

Препарати: гінкго білоба екстракт EGb 761 («Танакан», таблетки по 40 мг, виробництва «Бофур-Іпсен», Франція) дозою 40 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково; пентоксифілін («Трентал», таблетки по 100 мг, виробництва «Авентіс Фарма Лтд.», Індія) дозою 100 мг/кг,

$n=10$, внутрішньошлунково; пірацетам («Луцетам», таблетки по 800 мг, виробництва «Егіс», Угорщина) дозою 500 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково; прамірацетам («Прамистар», таблетки по 300 мг, виробництва «Менаріні Груп», Італія) дозою 300 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково; цереброкурин (ампули по 0,5 мл, виробництва «НІР», Україна) дозою 0,05 мл/кг, $n=10$, внутрішньоочеревинно; цитиколін (розчин для внутрішнього застосування — 100 мг/1 мл, виробництва «Феррер Інтернаціональ, С. А., Іспанія») дозою 500 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково; N-фенілацетил-L-пролін гліцину («Ноопепт», таблетки по 10 мг, виробництва «ЛЄККО», Росія) дозою 10 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково та N-карбамоїл-метил-4-феніл-2-піролідон («Ентроп», таблетки по 100 мг, виробництва «Олайнський ХФЗ», Латвія) дозою 100 мг/кг, $n=10$, внутрішньошлунково вводили 1 раз на добу протягом 20 діб, починаючи з 11-го дня експерименту та встановлення рівня гіперглікемії. Інтактним тваринам ($n=20$) і тваринам контрольної групи — АД ($n=20$) у відповідному режимі внутрішньошлунково вводили дистильовану воду.

На 30-ту добу тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. Для біохімічних досліджень фрагменти кори головного мозку гомогенізували у рідкому азоті. Цитозольну фракцію виділяли методом диференційованого центрифугування.

Загальну активність NO-синтази визначали флюорометричним методом у НАДФ-залежній реакції перетворення L-аргініну на цитрулін [11].

Вміст нітротирозину (НТЗ) визначали за допомогою твердофазового імуноферментного аналізу методом ELISA, застосовуючи стандартний тест-набір “Nitrotirosine ELISA Kit” (“HyCult biotechnology”) згідно з інструкцією.

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилася з використанням програми STATISTICA 6.1 (серійний номер AGAR 909 E415822FA) і включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їх похибок ($\pm m$), вірогідність різниці середніх арифметичних (p) за допомогою непараметричного U-критерію Манна — Уїтні [12].

Усі експериментальні процедури здійснені згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідках» і Конвенцією Ради Європи про охорону хребетних тварин, які використовуються в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведеними дослідженнями встановлено, що перебіг хронічної гіперглікемії призводив до суттєвого зниження активності NO-синтази — на 71,7 % ($p<0,001$) у гомогенатах кори головного мозку тварин з гіперглікемією. При цьому пригнічення функціонування даного ферменту супроводжувалося значущим зростанням рівня нітротирозину — в 3,5 рази ($p<0,001$) порівняно з показниками у групі інтактних тварин (табл. 1).

Застосування пірацетаму та пентоксифіліну сприяло суттєвому зниженню вмісту нітротирозину в тканинах кори головного мозку — на 34,1 ($p<0,001$) і на 17,8 % ($p<0,01$) відповідно порівняно з контролем. До того ж названі препарати не чинили суттєвого впливу на активність синтази оксиду азоту (див. табл. 1). У свою чергу, повторне, протягом 20 діб, використання екстракту гінкго білоба та ноопепту приводило до зростання активності NO-синтази відповідно на 30 та 51 % ($p<0,001$) при суттєвому, практично рівнозначному зменшенні кількості НТЗ на 41,8 і 38 % ($p<0,001$) відповідно (див. табл. 1). В інших групах тварин з гіперглікемією, що отримували

Таблиця 1

Вплив церебропротекторних препаратів на активність NO-синтази і вміст нітротирозину в тканинах головного мозку щурів із хронічною гіперглікемією, M±m

Група тварин	NO-синтаза, нмоль/(мг білка·хв)	Нітротирозин, нмоль/мг білка
Інтактні тварини, n=20	35,40±1,07	5,90±0,12
Контроль (АД), n=20	10,00±0,59###	20,80±0,49###
EGb 761, n=20	13,00±0,75***	12,10±0,27***
Ентроп, n=10	21,20±1,12***	12,20±0,67***
Ноопепт, n=10	15,10±0,64***	12,90±0,54***
Пентоксифілін, n=10	12,60±1,34	17,10±0,63**
Пірацетам, n=10	12,30±0,76	13,70±0,18***
Прамірацетам, n=10	18,30±0,80***	9,60±0,28***
Цереброкурин, n=10	33,40±4,07***	7,90±0,16***
Цитиколін, n=10	31,50±1,32***	10,50±0,62***

Примітка. ### — $p < 0,001$ щодо групи інтактних тварин; ** — $p < 0,01$ щодо контролю; *** — $p < 0,001$ щодо контролю.

ли прамірацетам і N-карбамоїл-метил-4-феніл-2-піролідон, показники рівня НТЗ, порівняно з групою тварин з гіперглікемією, були нижчими відповідно на 55,8 та 41,3 % ($p < 0,001$). При цьому активність синтази оксиду азоту суттєво — в 1,83 та 2,12 рази ($p < 0,001$) відповідно для прамірацетаму й ентропу була вищою порівняно зі значеннями, відміченими у групі контролю (див. табл. 1). Найвагоміші зміни дослідних показників були зафіксовані при застосуванні цереброкуруну та цитиколіну. Так, вміст НТЗ при використанні цих лікарських засобів, порівняно з показниками контролю, був відповідно на 62 та 49,5 % ($p < 0,001$) нижчим, водночас активність NO-синтази у 3,34 та 3,14 рази ($p < 0,001$) перевищувала дані групи контролю і статистично значущо не відрізнялася за значеннями від групи інтактних тварин.

Таким чином, отримані результати показують, що перебіг гіперглікемії призводить до пригнічення активності синтази оксиду азоту та розвитку нітрозуючого стресу в тканинах головного мозку, про що свідчить суттєве зростання рівня потенційно нейротоксичної речовини — нітротирозину. Вважається, що НТЗ є маркером утворення

пероксинітриду, однак не виключено, що і загальним індексом реактивних різновидів азоту [13; 14]. Водночас низька активність NO-синтази та високий рівень НТЗ можуть свідчити про низьку біодоступність оксиду азоту за даних умов, що призводить до нездатності цієї молекули виконувати свої фізіологічні функції, зокрема, брати участь у процесах синаптичної пластичності [3]. Дані явища можуть бути безпосередньо пов'язані з високою інтенсивністю процесів вільнорадикального окиснення та декомпенсацією систем антиоксидантного захисту при хронічній гіперглікемії в ЦНС [15–17]. За умов збиткової генерації вільних радикалів, NO може певним чином захищати мембрани клітин шляхом реакції з супероксидом, результат якої — утворення пероксинітриду [4].

Деструктивна дія вільних радикалів лежить в основі порушення функції мітохондрій і розвитку «енергетичного голоду» нейронів [18]. Використання ноотропних засобів у тварин із хронічною гіперглікемією сприяє зниженню інтенсивності перебігу реакцій нітрозилування білкових молекул, а також відновленню ступеня активності NO-синтази у тканинах

мозку. При цьому ступінь вираження нейропротективних властивостей дослідних препаратів був різним. Найсуттєвіша оптимізація досліджуваних показників зафіксована при застосуванні N-карбамоїл-метил-4-феніл-2-піролідону (ентроп), прамірацетаму, цереброкуруну та цитиколіну. Отримані результати корелюють із даними, зафіксованими раніше, згідно з якими дані лікарські засоби виявляють значний антиоксидантний потенціал, сприяють відновленню функції мітохондрій і зниженню явищ енергодефіциту нейронів за умов порушень мозкового кровообігу [15; 16; 18–23]. Найявність зазначених властивостей, поряд з оптимізацією функціонування системи оксиду азоту, може лежати в основі високої нейропротекторної активності вищезгаданих лікарських засобів.

Висновки

Перебіг тривалої гіперглікемії призводить до розвитку нітрозуючого стресу та зниження біодоступності оксиду азоту в тканинах головного мозку щурів.

Використання екстракту гінкго білоба, пентоксифіліну, пірацетаму, прамірацетаму, цереброкуруну, цитиколіну, N-фенілацетил-L-проліл гліцину (ноопепт) та N-карбамоїл-метил-4-феніл-2-піролідону (ентроп) неоднаковою мірою оптимізує співвідношення рівня нітротирозину й активності синтази оксиду азоту в тканинах головного мозку щурів з алоксаніндукованою гіперглікемією.

За ступенем активності дослідні препарати можна розмістити у такому порядку: цереброкурин \geq цитиколін $>$ прамірацетам \geq ентроп $>$ ноопепт = екстракт гінкго білоба $>$ пірацетам \geq пентоксифілін.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lowenstein C. I. Nitric oxide, a physiological messenger / C. I. Lowenstein, I. L. Oinerman, S. H. Snyder // Am. Intern. Med. – 2004. – Vol. 120. – P. 227–237.
2. Обухов Д. К. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных живот-

ных / Д. К. Обухов, Е. В. Пушина, А. А. Вараксин // *Успехи современного естествознания*. – 2011. – № 12. – С. 49–51.

3. Салей А. П. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения / А. П. Салей, М. И. Рецкий // *Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация*. – 2003. – № 1. – С. 75–80.

4. Сосунов А. А. Оксид азота как межклеточный посредник / А. А. Сосунов // *Соросовский образовательный журнал*. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 27–34.

5. Arvanitakis Z. Diabetes mellitus, dementia, and cognitive function in older persons / Z. Arvanitakis, R. S. Wilson, D. A. Bennett // *J. Nutr. Health. Aging*. – 2006. – Vol. 10, N 4. – P. 287–291.

6. Diabetes mellitus and dementia / F. Pasquier, A. Boulogne, D. Leys, P. Fontaine // *Diabetes Metab*. – 2006. – Vol. 32. – P. 403–414.

7. Reagan L. P. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity / L. P. Reagan, B. S. McEwen // *Neuroreport*. – 2002. – Vol. 13, N 14. – P. 1801–1804.

8. Воронина Т. А. Ноотропные и нейропротекторные средства / Т. А. Воронина, С. Б. Середенин // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2007. – Т. 70, № 4. – С. 44–58.

9. Dave K. R. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat / K. R. Dave, S. S. Katyare // *Journal of Endocrinology*. – 2002. – Vol. 175, N 1. – P. 241–250.

10. Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory recep-

tors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat / M. Garcia, A. Moran, E. Calama [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2005. – Vol. 145, N 5. – P. 593–601.

11. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. – К.: ДФЦ МЗ Украины, 2010. – 81 с.

12. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А. Халафян. – М.: Бином-Пресс, 2007. – 512 с.

13. Regulation of glucose metabolism by nitrosative stress in neural cells / J. P. Bolanos, P. Ciudad, P. Garcia-Nogales [et al.] // *Mol. Aspects Med*. – 2004. – Vol. 25, N 1/2. – P. 61–73.

14. Role of Nitrosative Stress and Peroxynitrite in the Pathogenesis of Diabetic Complications. Emerging New Therapeutical Strategies / P. Pacher, I. G. Obrosova, J. G. Mabley, C. Szabo // *Curr. Med. Chem*. – 2005. – Vol. 12, N 3. – С. 267–275.

15. Жилюк В. І. Стан процесів вільнорадикального окислення в утвореннях головного мозку у алоксан-діабетних щурів за умов застосування пірацетаму та прамірацетаму / В. І. Жилюк // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2009. – № 5 (12). – С. 47–51.

16. Состояние тиол-дисульфидного равновесия и системы оксида азота в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом в условиях терапии ноотропами / В. И. Жилюк, В. И. Мамчур, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова // *Вісник психіатрії та психофармакотерапії*. – 2010. – № 1 (17). – С. 77–83.

17. Михайличенко Т. Е. Динамика показателей свободнорадикального окисления у больных сахарным диабетом / Т. Е. Михайличенко // *Питання експериментальної та клінічної медицини*. – 2008. – Т. 2, № 12. – С. 102–107.

18. Влияние средств с ноотропными и нейропротекторными свойствами на процессы энергетического метаболизма и проявления митохондриальной дисфункции в нейронах головного мозга крыс с аллоксановым диабетом / В. И. Жилюк, В. И. Мамчур, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова // *Проблеми ендокринної патології*. – 2010. – № 3. – С. 69–74.

19. Фармакологическая модуляция соотношений NO и тиол-дисульфидной системы — новое направление нейропротекции / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова [и др.] // *Медицина неотложных состояний*. – 2010. – № 2 (27). – С. 65–71.

20. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник, С. В. Павлов [и др.] // *Международный неврологический журнал*. – № 4 (20). – С. 20–26.

21. Ахапкина В. И. Спектр фармакологических эффектов фенотропила / В. И. Ахапкина, Т. А. Воронина // *Фарматека*. – 2005. – № 13. – С. 19–25.

22. Citicoline // *Alternative Medicine Review*. – 2008. – Vol. 13, N 1. – P. 50–57.

23. Бурчинский С. Г. Ноотропы-рацетамы: смена поколений / С. Г. Бурчинский // *Сімейна медицина*. – 2008. – № 1. – С. 106–110.

UDC 615.214:616.831:543.272.32:616.379-008.64-092.9

V. I. Zhylyuk, V. Y. Mamchur

ВПЛИВ НООТРОПНИХ ЗАСОБІВ НА АКТИВНІСТЬ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ВМІСТ НІТРОТИРОЗИНУ В КОРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ ТРИВАЛОЮ АЛОКСАН-ІНДУКОВАНОЮ ГІПЕРГЛІКЕМІЄЮ

У дослідженнях на білих щурах встановлено, що тривала гіперглікемія індукує розвиток нітрозуючого стресу і зниження біодоступності оксиду азоту в тканинах головного мозку. Застосування досліджуваних ноотропних препаратів протягом 20 днів, починаючи з 11 діб дослідження, оптимізує співвідношення рівня нітротирозину й активності синтази оксиду азоту в тканинах головного мозку щурів з алоксан-індукованою гіперглікемією. За ступенем прояву нейропротекторної активності досліджені засоби можна розмістити так: цереброкурин \geq цитиколін $>$ прамірацетам \geq ентроп $>$ ноопепт = екстракт гінкго білоба $>$ пірацетам \geq пентоксифілін.

Ключові слова: алоксановий діабет, ноотропи, синтаза оксиду азоту, нітротирозин.

UDC 615.214:616.831:543.272.32:616.379-008.64-092.9

V. I. Zhylyuk, V. Y. Mamchur

INFLUENCE OF NOOTROPICS ON ACTIVITY OF NITRIC OXIDE AND CONTENT OF NITROTYROSINE IN BRAIN TISSUES OF RATS WITH ALLOXAN-INDUCED HYPERGLYCEMIA

It has been established experimentally that long-term hyperglycemia induces development of nitrosative stress and reduces nitric oxide bioavailability in brain tissues of white rats. Administration of nootropic drugs during 20 days starting from 11 day of the study optimizes correlation of nitrotyrosine content and nitric oxide synthase activity in brain tissues of rats with alloxan-induced hyperglycemia. Researched drugs can be ranked by degree of their neuroprotective activity as follows: cerebrocurin \geq citicoline $>$ pramiracetam \geq entrop $>$ noopept = Ginkgo Biloba extract $>$ piracetam \geq pentoxifylline.

Key words: alloxan diabetes, nootropic drugs, nitric oxide synthase, nitrotyrosine.