



УДК 616.8:615.21

© 2012

Ю. М. Колесник, член-корреспондент НАН України **И. С. Чекман,**
И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Н. А. Горчакова, Л. И. Кучеренко,
Н. В. Бухтиярова, А. В. Абрамов

Влияние тиотриазолина на интегративную функцию центральной нервной системы крыс при хронической алкогольной интоксикации

При хронической алкогольной интоксикации нарушается интегративная функция центральной нервной системы. Это обусловлено снижением в нервных клетках содержания РНК, увеличением апоптотических нейронов, а также нарушением энергетического обмена в нервных клетках. Этиловый спирт подавляет активность цитохром-С-оксидазы и супероксиддисмутазы, снижает уровень гликогена, глюкозо-6-фосфата, малата, АТФ. Тиотриазолин нормализует отмеченные изменения в нервных клетках. Эссенциале оказывает значительно менее выраженный нормализующий эффект.

Актуальной социальной и медицинской проблемой, стоящей перед современным обществом, является разработка эффективных методов лечения алкоголизма. В комплексной фармако-терапии алкоголизма применяют различные лекарственные средства, в том числе церебро-протекторы (тиотриазолин, пирацетам, цитофлавин и т. д.) [1, 2]. Механизм положительного влияния тиотриазолина при алкоголизме не установлен, что послужило обоснованием для изучения возможных механизмов терапевтического действия данного препарата у крыс при экспериментальной хронической алкоголизации.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 80 нелинейных белых крысах-самцах, полученных из питомника ГУ “Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины”. Возраст крыс составил 4,5 месяца, масса тела — 170–190 г. Ежедневно на протяжении 20 сут всех животных взвешивали и осматривали. Осмотр включал в себя оценку общего состояния и поведения.

Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали ежедневным внутрижелудочным введением животным первые 10 сут — 15% раствора этанола в дозе 4 г/кг, следующие 10 сут — 15% раствора этанола в дозе 6 г/кг и последующие 10 сут — 25% раствора этанола в дозе 4 г/кг. С 30 сут прекращали алкоголизацию, проводили экспериментальную терапию тиотриазолином и продолжали наблюдение в течение 14 сут [3]. Тиотриазолин вводили внутрижелудочно с помощью металлического зонда в дозе 50 мг/кг, эссенциале из капсул —

по той же схеме в дозе 200 мг/кг. Контрольные животные в течение 14 сут получали физиологический раствор. Животных выводили из эксперимента на 45 сут.

О нейропротективном действии тиотриазолина судили по улучшению морфофункциональных показателей нейронов IV–V слоев коры, а также по показателям энергетического обмена, антиоксидантной системы в головном мозге, когнитивных функций ЦНС и по изменению содержания антиапоптотического белка Bcl-2 [3]. В цитозоле головного мозга экспериментальных животных определяли содержание глюкозо-6-фосфата, гликогена, АТФ, малата и активность цитохром-С-оксидазы, по которым судили о состоянии энергетического обмена [4]. По активности супероксиддисмутазы (СОД), содержанию продуктов окислительной модификации белка — альдегидфенилгидразонов (АФГ) и карбоксифенилгидразонов (КФГ) оценивали состояние антиоксидантной системы и процессов оксидативного стресса [3, 4]. Мозг фиксировали в жидкости Буэна (24 ч) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 5-микронные гистологические срезы в области постцентральной извилины. При этом в плоскости среза находилась зона сомато-сенсорной коры больших полушарий. Для изучения морфофункционального состояния нейронов гистологические срезы депарафинировали по стандартной методике и окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону. Гистологический анализ проводили на микроскопе Axioskop (“Zeiss”, Германия) [3, 6].

Нарушение ориентировочно-исследовательской активности животных определяли в тесте “открытое поле” на 44 сут эксперимента [5]. Сохранность когнитивных функций оценивали по способности животных к обучению и запоминанию аверсивного стимула в тесте условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Данная методика основана на врожденном стремлении крыс к ограниченному затемненному пространству. Обучение крыс проводили в двухкамерной установке, состоящей из двух отсеков — светлого и темного. Крысу помещали в светлый отсек, фиксировали латентное время захода в темный отсек, где крыса получала удар током и выбегала в светлый отсек. Воспроизведение УРПИ проверяли через 24 ч. О сохранности навыка судили по изменению латентного времени захода крысы в темный отсек [3, 5].

Для определения содержания Bcl-2 белков методом иммуноблоттинга проводили выделение нейронов коры мозга в два этапа [3]. На первом этапе мозговую ткань дезинтегрировали с целью получения клеточной суспензии, на втором — осуществляли дифференциальное ультрацентрифугирование. Для приготовления белковых проб клетки собирали, отделяя их от субстрата смесью растворов трипсина и версена (1 : 1), трижды промывали в 10 мл холодного PBS, центрифугируя при 200 g в течение 5 мин. К клеточному осадку добавляли 100 мкл лизирующего буфера, состоящего из 20 mM *трипс*-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Тритона X-100, 2 mM EDTA и 1 mM PMSF (“Sigma”, США). Экстракты центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию общего белка по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970). После перенесения белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану ее инкубировали в течение 1 ч с моноклональными антителами к Bcl-2 и с вторичными антителами против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченными пероксидазой хрена (“Sigma”, США).

Результаты представлены в виде выборочного среднего значения \pm стандартная ошибка среднего значения. Достоверность отличий между экспериментальными группами определяли с помощью непараметрического критерия U Манна–Уитни. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p < 0,05$). Результаты исследования обраба-

тывали с применением статистического пакета лицензионной программы “STATISTICA for Windows 6.1” (StatSoft Inc., № AXX R712D833 214SAN5), а также “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003”.

Результаты и их обсуждение. По данным экспериментальных исследований установлено, что 30-суточная хроническая алкоголизация приводит к гибели половины крыс и сопровождается признаками, характеризующими состояние алкогольной интоксикации: ригидность хвоста, гиперемия мордочки, хаотичное передвижение животных по клетке. У животных угнеталась ориентировочно-исследовательская активность, наблюдалось развитие когнитивного дефицита (табл. 1). Так, у крыс контрольной группы снижалось количество горизонтальных, вертикальных перемещений и заглядывания в “норку”. Также уменьшался латентный период УРПИ, характеризующий процессы обучения и памяти. При назначении тиотриазолина отмечалось отсутствие летальности и значительное снижение признаков алкогольной интоксикации ЦНС — у животных активировалась ориентировочно-исследовательская деятельность и повышалась сохранность УРПИ. У животных, получавших тиотриазолин, наблюдалось достоверное увеличение количества горизонтальных перемещений — на 68%, вертикальных перемещений — на 111 % и числа заглядываний в “норку” — на 95%, а также повышение сохранения памятного следа УРПИ. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований, которые показали высокую церебропротективную активность тиотриазолина при нарушении мозгового кровообращения, иммобилизационном стрессе, черепно-мозговой травме [7, 8]. Назначение эссенциале снижало летальность на 30%, но не оказывало защитного действия в отношении сохранности когнитивно-мнестических функций ЦНС.

Хроническое введение крысам этанола в течение 30 сут приводило к уменьшению площади тел нейронов в сочетании со снижением в них содержания РНК по сравнению с интактными животными, что свидетельствовало о сморщивании нейронов и нарушении транскрипционных и трансляционных процессов (табл. 2). При этом наблюдалось увеличение апоп-

Таблица 1. Влияние тиотриазолина на выживаемость и интегративную функцию ЦНС животных после 30-суточной алкоголизации ($n = 10$)

Группа животных	Количество горизонтальных движений (3 мин)	Количество вертикальных движений (3 мин)	Количество заглядываний в норку (3 мин)	УРПИ, с	Выживаемость, %
Интактные	$36,5 \pm 11,8$	$14,5 \pm 5,2$	$28,8 \pm 6,0$	$127,7 \pm 8,3$	100
Контроль (этанол)	$17,7 \pm 2,5^*$	$5,2 \pm 1,5^*$	$7,0 \pm 1,0^*$	$77,0 \pm 4,7^*$	50
Тиотриазолин	$29,8 \pm 2,8^{**}$	$11,0 \pm 2,5^{**}$	$20,7 \pm 3,0^{**}$	$106,5 \pm 6,8^{**}$	100
Эссенциале	$18,7 \pm 4,5$	$6,3 \pm 1,4$	$10,0 \pm 2,5^{**}$	$80,4 \pm 7,3$	70

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 $^*P < 0,05$ по сравнению с интактными животными; $^{**}P < 0,05$ по сравнению с контролем (этанол).

Таблица 2. Характеристика нейронов IV–V слоев коры головного мозга крыс после 30-суточной алкоголизации

Группа животных	Плотность нейронов, клеток/мм ²	Площадь тел нейронов, мкм ²	Содержание РНК в нейронах, Еоп	Плотность апоптических клеток на 1 мм ²
Интактные	1067 ± 15	$60,16 \pm 0,49$	$6,63 \pm 0,02$	52 ± 2
Контроль (этанол)	1052 ± 9	$46,49 \pm 0,32^*$	$5,77 \pm 0,03^*$	$107 \pm 10^*$
Тиотриазолин	1060 ± 7	$67,87 \pm 0,41^{**}$	$6,88 \pm 0,10^{**}$	$79 \pm 7^{**}$
Эссенциале	1054 ± 12	$48,41 \pm 0,30$	$5,80 \pm 0,03$	100 ± 12

тических нейронов, что указывает на инициацию апоптоза. В результате терапии тиотриазолином у крыс с экспериментальным алкоголизмом усиливались процессы адаптивного протеинсинтеза, восстанавливались транскрипционные процессы в нейронах, о чем судили по достоверному увеличению площади нейронов и увеличению уровня ядерного РНК. Кроме того, назначение тиотриазолина достоверно снижало развитие апоптических изменений нейронов, о чем свидетельствовало уменьшение плотности апоптически измененных клеток. Назначение эссенциале не оказывало достоверного нейропротективного эффекта.

В головном мозге крыс с явлениями хронической алкоголизации наблюдалось угнетение энергетического метаболизма. Так, отмечено снижение активности цитохром-С-оксидазы, уменьшение уровня гликогена, глюкозо-6-фосфата, малата, торможение продукции АТФ, усиление процессов окислительной модификации белка мозга и увеличение содержания маркерных продуктов — АФГ и КФГ на фоне угнетения активности СОД (табл. 3). Тиотриазолин оказывал нормализующее действие на изучаемые показатели энергетического метаболизма головного мозга (уровень малата повысился на 58%, гликогена — на 21%, глюкозо-6-фосфата — на 20%, активность цитохром-С-оксидазы возросла на 19%), при этом интенсифицировались процессы аэробной продукции АТФ на 43%. Препарат также приводил к уменьшению проявлений оксидативного стресса в головном мозге (снизился уровень маркеров — АФГ на 30%, КФГ на 22%) на фоне повышения активности СОД на 61%.

Полученные результаты экспериментальных исследований на модели хронической алкогольной интоксикации свидетельствуют о нарушении когнитивно-мнестической функции головного мозга животных, уменьшении площади нейронов, уровня ядерного РНК, нарушении апоптических изменений нейронов. Тиотриазолин проявляет нейропротективное действие при насильственной алкоголизации, что отличает его от эссенциале, не имеющего подобного действия. Также установлено, что по силе влияния на поведение и память животных, выживаемость нейронов, энергетический метаболизм, антиоксидантную активность мозга в условиях алкоголизации тиотриазолин в отличие от эссенциале обладает достоверным нейропротективным действием.

Регуляция апоптоза в нервной системе осуществляется многочисленными сигнальными системами. При этом пути реализации этого процесса могут быть различными: модуляция активности ферментов, факторов транскрипции (p53, AP-1, NF-κB), прямая активация генов раннего немедленного ответа (c-jun, c-fos). Первичная реакция со стороны нервной клетки на апоптическое воздействие, по-видимому, реализуется генами раннего немедленного ответа. Активация этих генов рассматривается как один из основных, сохранившихся в эволюции, компонентов нейронального ответа на повреждение. Данные гены относятся к протоонкогенам, причем наиболее постоянно в центральной нервной системе отмечается

Таблица 3. Биохимические показатели головного мозга крыс после 30-суточной алкоголизации

Показатель	Интактные животные	Контроль (этанол)	Тиотриазолин	Эссенциале
Глюкозо-6-фосфат, мкм/г	0,875 ± 0,01	0,711 ± 0,02	0,857 ± 0,01*	0,722 ± 0,05
АТФ, мкм/г	2,90 ± 0,11	2,00 ± 0,07*	2,87 ± 0,06**	2,00 ± 0,08
Малат, мкм/г	0,47 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,54 ± 0,08**	0,33 ± 0,05
Гликоген, мг/г	20,3 ± 2,1	16,5 ± 1,5*	20,0 ± 2,5**	16,8 ± 4,2
Цитохром-С-оксидаза, мкмоль/г/мин	0,95 ± 0,03	0,77 ± 0,02*	0,92 ± 0,05**	0,79 ± 0,08
СОД, у. е./мг/мин	285,5 ± 12,0	178,5 ± 10,0*	288,4 ± 10,4**	180,4 ± 14,7
АФГ, у. е./г	4,77 ± 0,3	7,4 ± 0,2*	5,22 ± 0,2**	7,00 ± 0,3
КФГ, у. е./г	6,3 ± 0,7	10,0 ± 1,2*	7,88 ± 0,4**	9,23 ± 0,23

Таблица 4. Экспрессия белка Bcl-2 в головном мозге крыс после 30-суточной алкоголизации ($n = 10$)

Группа животных	Общий белок, г	Площадь, мм ²	Оптическая концентрация, у. е.	Оптическое содержание, у. е.
Интакт	4,8 ± 0,02	58,27 ± 1,1	0,17 ± 0,001	6,81 ± 0,21
Контроль	4,9 ± 0,01	57,32 ± 1,2	0,05 ± 0,01	0,89 ± 0,07
Тиотриазолин	4,8 ± 0,01	59,77 ± 1,2	0,14 ± 0,002*	4,97 ± 0,11*

экспрессия c-jun. Его продуктом является регуляторный протеин c-jun, который относится к факторам транскрипции, реализующим клеточный ответ на повреждение через активацию или репрессию генов. Регуляция апоптоза во II стадии (эффекторной) осуществляется преимущественно белками семейства Bcl-2, причем выделяют два класса этих белков: тормозящие апоптоз (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Bbag-1, Mcl-1, A-1) и индуцирующие этот процесс (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Hrk). Все белки этого семейства во многом гомологичны между собой, что позволяет им взаимодействовать друг с другом. Соотношение белков Bcl-2 агонистов и антагонистов апоптоза определяет способность клетки, в том числе и нейрона, отвечать на апоптотические сигналы. Допускается, что антиапоптотическое действие Bcl-2 связано с нормализацией функции митохондрий, которые участвуют в реализации апоптоза. Конкретными механизмами этого процесса являются: 1) блокирование высвобождения из митохондрий цитохрома-C; 2) участие белков Bcl-2 в формировании трансмембранных митохондриальных пор, что определяет трансмембранный потенциал, а также высвобождение различных активных соединений и ионов из митохондрий; 3) возможность проникновения этих белков в липидные структуры мембран и формирование ионных каналов, что имеет значение в субклеточном распределении Ca²⁺ между ядром, митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом [7–9].

В группе контроля на фоне алкоголизации нами впервые было определено снижение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 (табл. 4). Повышение экспрессии белка Bcl-2 в группе животных, получавших тиотриазолин, свидетельствует об активации антиапоптотической защиты поврежденных нейронов.

Терапевтическое действие тиотриазолина обусловлено его способностью регулировать синтез белка и фосфолипидов, которые принимают участие в процессах памяти, а также повышать скорость оборота информационных макромолекул за счет защиты их структуры от окислительной модификации и энерготропного действия [7,10–12]. Кроме того, тиотриазолин способен регулировать нейроапоптоз, снижая его раннюю NO-опосредованную инициацию [7, 12] и повышая экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Эссенциале оказывает менее выраженный лечебный эффект. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием для широкого применения тиотриазолина в комплексной терапии алкогольной болезни.

1. *Альтшулер В. Б.* Клиника алкоголизма: Руководство по наркологии / Под ред. Н.И. Иванца. – Москва: Медпрактика, 2002. – Т. 1. – С. 203–233.
2. *Слободянюк П. М.* Клінічні й психопатологічні особливості формування та перебігу алкогольної залежності у чоловіків в аспекті їх інтегративної психотерапії // Мед. психологія. – 2010. – 5, № 3(19). – С. 84–92.
3. *Чекман И. С., Громов Л. А., Беленичев И. Ф. и др.* Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. рекомендации Государственного фармакологического центра МЗ Украины. – Киев, 2010. – 81 с.
4. *Прохорова М. И.* Методы биохимических исследований. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.

5. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Пер. с англ. – Москва: Высш. шк., 1991. – 399 с.
6. Kolesnik Y. M. Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement // *Microscopy and Analysis*. – 2002. – No 5. – P. 12–16.
7. Belenichev I. F., Odnokoz E. N., Gorbacheva S. V. The study of possible influence of reduced glutathione on regulation apoptosis in neuron of cerebral cortex // *ESF-EMBO Symp. "Glutathione and Related Thiols in Living Cells"*, 4–9 Sept. 2011. – Sant Feliu de Guixols, Spain, 2011. – 211 p.
8. Беленичев И. Ф., Соколик Е. П. Фармакологическая модуляция системы оксида азота при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс // *Экспер. и клин. фармакология*. – 2011. – 74, № 10. – С. 43–45.
9. Belenichev I., Sokolik E. Nitrozone stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – 11, No 4. – P. 12–17.
10. Мазур И. А., Волошин Н. А., Чекман И. С. Тиотриазолин. – Запорожье; Львов: Наутилус, 2005.
11. Мазур И. А., Чекман И. С., Беленичев И. Ф. и др. Метаболитотропные препараты. – Запорожье: ИД “Заславский”, 2007. – 304 с.
12. Беленичев И. Ф., Черний В. И., Колесник Ю. М. и др. Рациональная нейропротекция. – Донецк: ИД “Заславский”, 2009. – 262 с.

Національний медичинський університет
 ім. А. А. Богомольця, Київ
 Запорозький державний медичинський
 університет
 НПО “Фарматрон”, Запорожье

Поступило в редакцію 26.12.2011

Ю. М. Колесник, член-кореспондент НАН України **І. С. Чекман**, **І. А. Мазур**,
І. Ф. Беленічев, **Н. О. Горчакова**, **Л. І. Кучеренко**, **Н. В. Бухтіярова**,
А. В. Абрамов

Вплив тіотриазоліну на інтегративну функцію центральної нервової системи щурів при хронічній алкогольній інтоксикації

При хронічній алкогольній інтоксикації порушується інтегративна функція центральної нервової системи. Це зумовлено зниженням у нервових клітинах вмісту РНК, збільшенням апоптичних нейронів, а також порушенням енергетичного обміну у нервових клітинах. Етиловий спирт пригнічує активність цитохром-С-оксидази і супероксиддисмутази, знижує рівень глікогену, глюкозо-6-фосфату, малату, АТФ. Тіотриазолін нормалізує відмічені зміни в нервових клітинах. Есенціале виявляє значно менш виражений нормалізуючий ефект.

Ju. M. Kolesnik, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. S. Chekman**,
I. A. Mazur, **I. F. Belenichev**, **N. A. Gorchakova**, **L. I. Kucherenko**,
N. V. Buhtyyarova, **A. V. Abramov**

Effect of thiotriazolin on rats' nervous central system integrative function under chronic alcohol intoxication

Under chronic alcohol intoxication, the central nervous system integrative function is disturbed. This is due to a decrease of the RNA content, increase of apoptotic neurons, and the violation of energy metabolism in nerve cells. Ethyl alcohol inhibits the activity of cytochrome-C oxidase and superoxide dismutase and reduces the glycogen, glucose-6-phosphate, malate, and ATP levels. Thiotriazolin normalizes marked changes in nerve cells. Essentiale shows a much less pronounced normalizing effect.