



А.Н. Егоров, И.Ф. Беленичев, Е.П. Соколик, Л.И. Кучеренко

РОЛЬ НИТРОЗИРУЮЩЕГО СТРЕССА В МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОДЕСТРУКЦИИ В УСЛОВИЯХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ПУТИ ФАРМАКОКОРРЕКЦИИ ВОЗНИКАЮЩИХ НАРУШЕНИЙ

Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: нітрозуючий стрес, тіоцетам, цереброкурин, пренатальна алкоголізація, оксид азоту.

Ключевые слова: нитрозирующий стресс, тиоцетам, цереброкурин, пренатальная алкоголизация, оксид азота.

Key words: nitrosative stress, thioacetam, cerebrocurin, prenatal alcoholism, nitrogen oxide.

При формуванні у щурів пренатальної алкогольної інтоксикації на 25 добу життя відзначено підвищення активності NO-синтази на фоні дефіциту L-аргініну та збільшення вмісту стабільних метаболітів NO – нітритів. У тканинах мозку паралельно виявлено депривацію антиоксидантної системи – активності каталази та супероксиддисмутази порівняно з інтактною групою. Курсове введення новонародженим щурам з пренатальною алкоголізацією цереброкуруну, тіоцетаму та пірацетаму з 1 до 25 дня життя призводило до нормалізації у зв'язаних системах оксиду азоту та антиоксидантних ферментів і зменшення нітрозуючого стресу в нервовій тканині.

При формуванні у крыс пренатальної алкогольної інтоксикації на 25 сутки життя відзначено підвищення активності NO-синтази на фоні дефіциту L-аргініну та збільшення вмісту стабільних метаболітів NO – нітритів. В тканинах мозку паралельно виявлено депривацію антиоксидантної системи – активності каталази та супероксиддисмутази порівняно з інтактною групою. Курсове введення новонародженим крысам, підвергнутим пренатальній алкоголізації, цереброкуруну, тіоцетаму та пірацетаму з 1 по 25 день життя приводило до нормалізації в сопряжених системах оксиду азоту та антиоксидантних ферментів і зменшення нітрозуючого стресу в нервовій тканині.

Under the conditions of formation of prenatal alcohol intoxication in rats on 25th day of life increased activity of NO-synthase on a background of deficiency of L-arginine and increasing of stable metabolites NO – nitrites content were noted. At the same time in the tissues of the brain deprivation of antioxidant system - activity of catalase and superoxide dismutase (SOD) was revealed in comparison with the intact group. Course introduction of cerebrocurin, thioacetam and piracetam from the 1st to the 25th day of life to newborn rats exposed to prenatal alcoholization led to the normalization of the conjugate systems of nitric oxide and antioxidant enzymes and decrease of nitrosative stress in nervous tissue.

Фетальный алкогольный синдром – это пожизненное нарушение, которое объединяет отклонения в психофизическом развитии, причиной которых является злоупотребление матерью алкоголем до и во время беременности. Эпидемиологические исследования последних лет свидетельствуют, что алкогольный синдром плода (АСП) встречается с частотой 1–3 на 1000 новорожденных, причем указывается на недостаточную диагностику этого синдрома. В период беременности алкоголь оказывает тератогенное, мутагенное и токсическое действие на плод [1]. Следствие этих эффектов – АСП. По мнению большинства исследователей, ведущими факторами в патогенезе АСП являются сам алкоголь [2], а также его метаболит ацетальдегид [3]. Алкоголь способен легко проникать через плацентарный барьер и оказывать прямое токсическое действие на клетки плода. Наиболее выраженный эмбриотоксический эффект алкоголь и ацетальдегид вызывают в период интенсивного деления клеток плода. В связи с этим, самым опасным периодом беременности (в плане возникновения АСП) является первый триместр, когда происходит процесс органогенеза и клетки зародыша наиболее уязвимы к действию алкоголя и ацетальдегида. Одним из механизмов тератогенного воздействия алкоголя на ранних этапах эмбриогенеза является повреждение молекул L1, отвечающих за нормальную миграцию развивающихся клеток [4]. Токсическое влияние алкоголя в первые три недели беременности приводит к «клеточной смерти», сопровождающейся грубыми пороками развития

ЦНС, сердца, почек и других органов плода, и часто является причиной его внутриутробной гибели [5].

Несмотря на довольно широкое освещение затронутой проблемы в литературе, дальнейшее развитие детей, родившихся в семьях алкоголиков, остается малоизученным. Требуют более детального рассмотрения особенности реакций детского организма в раннем возрасте, когда нервная, иммунная системы и метаболизм организма наиболее уязвимы по отношению к внешним воздействиям. Поэтому раскрытие молекулярно-биохимических механизмов гибели нейрона в условиях пренатальной алкоголизации и разработка способов фармакологической коррекции является одной из актуальных задач современной педиатрии, неврологии и фармакологии. Особый интерес в качестве средств фармакокоррекции представляют нейропротективные средства, зарекомендовавшие себя в экспериментальной терапии алкогольной энцефалопатии – цереброкурин, тиоцетам и пирацетам [6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка нейропротективного действия тиоцетаму, пирацетаму и цереброкуруну по снижению показателей нитрозирующего стресса в головном мозге крыс, подвергнутых пренатальной насильственной алкоголизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на самках белых крыс массой 150–180 г, полученных из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины». Крысы с 5 по 20 день беременности получали этанол в дозе 6–8 г/кг/день, кон-

Влияние исследуемых препаратов на антиоксидантные ферменты в митохондриальной и цитозольной фракциях нейронов крыс после пренатальной алкоголизации и последующей 25-дневной терапии

Показатели	Группы	Интакт	Контроль (пренатальная алкоголизация)	Тиоцетам	Цереброкурин	Пирацетам
цТ-СОД, у.е./мг/мин		150,6±0,12	68,9±0,92	191,1±1,6*	214,2±1,1*	70,5±0,78*
мх-СОД, у.е./мг/мин		164,7±0,16	76,4±0,56	118,8±0,67*	145,8±0,43*	129,9±0,27*
цТ-Каталаза, мкат/мг белка		7,65±1,23	2,43±0,31	5,96±1,59*	7,22±1,81*	4,41±0,74*
мх-Каталаза, мкат/мг белка		7,98±1,32	2,86±0,65	6,61±1,71*	7,92±1,93*	4,78±0,82*

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля.

трольные крысы – изокалорический раствор сахарозы. Потомству алкоголизированных крыс сразу после рождения в течение 25 дней внутрибрюшинно вводили тиоцетам (125 мг/кг), пирацетам (125 мг/кг) и цереброкурин (0,05 мл/кг), контроль получал физиологический раствор. В каждой группе было по 20 новорожденных животных. Биохимические исследования головного мозга проводили на 26 сутки эксперимента, с этой целью животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (30 мг/кг). Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга проводили методом дифференциального центрифугирования методом Мак-Ильвейна и Роднайт [7,8].

Количественное определение нитрозиловых протеинов проводили с помощью ELISA-набора NITROTYROSINE, который представляет собой твердофазный энзимсвязывающий иммуносорбентный набор, работающий по принципу «сэндвича».

Активность NO-синтазы и L-аргинина определяли флуориметрическим способом [9]. Уровень каталазы определяли спектрофотометрически [10]. Также определяли показатели супероксиддисмутазы (СОД) [11]. Свободные метаболиты NO определяли по методике Грисса [12].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета анализа программ статистической обработки результатов, версии Microsoft Office Excell 2003. Данные представлены в виде выборочного среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения. Достоверность отличий между экспериментальными группами оценивали при помощи t-критерия Стьюдента и U-критерия Уитни-Манна, компьютерной программы «STATISTICA for Windows 6.0» (StatSoft Inc., №AXXR712D833214FAN5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При формировании у крыс пренатальной алкогольной интоксикации на 26 сутки жизни отмечено повышение активности в системе оксида азота головного мозга животных. Так, в эти сроки наблюдения регистрировали значительное повышение активности NO-синтазы на фоне дефицита L-аргинина и увеличения содержания стабильных метаболитов NO – нитритов. В тканях мозга параллельно выявлена депривация антиоксидантной системы – активности каталазы и СОД по сравнению с интактной группой. В предыдущих работах указано, что значительное повышение активности NO-синтазы

на фоне дефицита L-аргинина и депривации антиоксидантных ферментов приводит не к продукции NO, а к образованию его цитотоксического деривата – пероксинитрита – и к дальнейшей инициации нитрозирующего стресса. Так, в тканях мозга экспериментальных животных на 26 день жизни обнаруживали повышение уровня ключевого маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина. Это свидетельствует, что в условиях пренатальной алкогольной интоксикации в нервной ткани формируется неблагоприятный метаболический фон, приводящий к развитию нитрозирующего стресса, который, в свою очередь, ведет к гиперпродукции цитотоксических дериватов оксида азота (иона нитрозония, пероксинитрита), которые атакуют белковые молекулы, образуя о-тирозин, 6-нитротриптофан, 3-нитротирозин, 3-хлортирозин, 2-оксогистидин, а также разнообразные карбонильные производные. N-, S-нитрозирование белковых фрагментов мембран нейронов ухудшает чувствительность и специфичность рецепторов, генерацию, образование и проводимость нервного импульса, нарушает синаптическую передачу [13]. Эти изменения приводят к нарушению секреторной, инкреторной, транспортной функции нейронов, а также к снижению когнитивно-мнестических функций организма [14].

Наибольшее значение в защите нейрона в условиях алкогольного повреждения имеет СОД, которая содержит тиольные группы (цистеин, метионин и цистин), а также гистидиносодержащие дипептиды (карнозин, анзерин, гомокарнозин). Нейроны с дефицитом СОД менее устойчивы к повышенным концентрациям глутамата, перекиси водорода и доноров NO [15] (табл. 1).

Курсовое введение новорожденным, подвергнутым пренатальной алкоголизации, цереброкурина, тиоцетама и пирацетама с 1 по 25 день жизни приводило к нормализации в сопряженных системах оксида азота и антиоксидантных ферментов и уменьшению нитрозирующего стресса в нервной ткани.

Референс-препарат пирацетам оказался наименее активным по всем исследуемым показателям достоверно по отношению к цереброкуруину и тиоцетаму.

Результаты исследования определили наиболее эффективный препарат в отношении показателей нитрозирующего стресса – цереброкурин, который приводил к нормализации активности



Показатели системы оксида азота в головном мозге крыс
после пренатальной алкогольной интоксикации и последующего 25-дневного лечения

Показатели	Группы	Интакт	Контроль (пренатальная алкоголизация)	Тиоцетам	Цереброкурин	Пирацетам
цт-Нитротирозин нмоль/г белка		32,1±1,5	87,2±4,8	41,1±2,1*	61,4±1,3*	85,0±3,5*
мх-Нитротирозин нмоль/г белка		10,0±0,5	37,2±1,8	16,0±1,4*	21,1±1,2*	30,7±1,3*
цт-Свободные метаболиты оксида азота (NO ₂), мкМ/г ткани		4,54±0,9	14,15±2,8	8,93±1,76*	5,67±1,02*	10,1±1,23*
мх- Свободные метаболиты оксида азота (NO ₂), мкМ/г ткани		2,12±0,67	7,32±1,81	3,95±0,86*	2,87±0,62*	5,34±0,73*
цт-NO-синтаза, нмоль/мг/белка/мин		2,43±0,41	5,98±1,12	3,24±0,81*	2,11±0,65*	4,35±0,32*
мх-NO-синтаза, нмоль/мг/ белка/мин		1,93±0,23	3,11±0,82	1,89±0,76*	1,56±0,42*	2,13±0,21*
цт-L-аргинин, мкмоль/г ткани		3,75±0,61	0,88±0,21	2,93±0,54*	3,75±0,71*	1,67±0,33*
мх-L-аргинин, мкмоль/г ткани		2,21±0,42	0,39±0,19	1,78±0,35*	2,13±0,47*	0,88±0,21*

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы.

NO-синтазы, а также повысил содержание L-аргинина и снизил уровень нитротирозина. Также цереброкурин наиболее значимо повышал активность каталазы и супероксиддисмутазы, что и обеспечило выраженную нейропротекцию.

Известно, что цереброкурин тормозит пероксидацию мембранных фосфолипидов, тормозит активность липоксигеназы в каскаде арахидоновой кислоты, блокирует продукцию O₂' и O₂G активированными лейкоцитами, ингибирует индуцибельную NO-синтазу и защищает от действия ONOO-. Цереброкурин тормозит экспрессию провоспалительных цитокинов, уменьшает степень цитотоксического отека. Установлено, что препарат опосредованно (через снижение уровня АФК) тормозит выработку факторов транскрипции и в дальнейшем снижает экспрессию генов, ответственных за синтез индуцибельной NO-синтазы [15].

Тиоцетам также оказывал достоверное воздействие в отношении показателей нитрозирующего стресса, причем по степени снижения нитротирозина он превосходил действие не только референт-препарата пирацетама, но и цереброкурина. Подобное действие тиоцетама связано с наличием в его составе 3-метил-1,2,4-триазолил-5 тиоацета, являющегося специфическим скаведжером цитотоксических дериватов NO. Тиоцетам также оказывал выраженное позитивное действие в отношении активности антиоксидантных ферментов головного мозга – СОД и каталазы. При этом тиоцетам не проявлял модулирующего действия в отношении продукции NO (табл. 2).

Известно, что тиоцетам тормозит выработку АФК биоэнергетическими системами в условиях алкогольной интоксикации мозга, реактивирует антиоксидантные ферменты, особенно СОД, защищает запасы α -токоферола, снижает образование стабильных продуктов жирных кислот в нервной ткани, тормозит развитие нитрозирующего стресса, оказывает выраженное нейропротективное действие. Тиоцетам способствует повышению биодоступности NO, защищая ее от АФК предотвращая образование пероксинитрита [16].

ВЫВОДЫ

Формирование пренатальной алкогольной интоксикации у крыс приводит к развитию нитрозативного стресса.

Курсовое введение цереброкурина животным, подвергнутому пренатальной алкогольной интоксикации с 1 по 25 день жизни, приводило к уменьшению проявлений нитрозирующего стресса в нервной ткани за счет нормализации активности NO-синтазы, снижению продукции NO и повышению активности антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы.

Курсовое введение тиоцетама также тормозило развитие нитрозирующего стресса в нервной ткани, вызванного пренатальной алкоголизацией, за счет прямого ингибирования цитотоксических форм NO и к повышению активности антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы.

Экспериментальные данные являются основанием для применения цереброкурина и тиоцетама в качестве нейропротекторов в комплексной терапии нейродеструктивных нарушений после пренатального алкоголизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sreenathan R.N. Drug Alcohol Depend / R.N. Sreenathan, R. Padmanabhan, S. Singh // Alcohol Depend. – 1982. – V. 9, №4. – P. 339–350.
2. Michaelis E.K. Fetal Alcohol Syndrome / E.K. Michaelis, M.I. Michaelis // Alcohol Health Res. World. – 1994. – V. 18, №1. – P. 17–23.
3. Hamby-Mason R. Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain / R. Hamby-Mason, J. Chen, S. Schenker // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1997. – V. 21, №6. – P. 1063–1072.
4. Matson S.N. Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention / S.N. Matson, E.P. Riley, E.L. Abel. – CRC Press, 1996.
5. Cartwright M.M. Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: Partial basis for the fetal alcohol syndrome / M.M. Cartwright, L.L. Tessmer, S.M. Smith // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1998. – V. 22, №1. – P. 142–149.
6. Беленичев И.Ф. Новые возможности лечения алкогольной болезни. Перспективы применения Цереброкурина / И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов, Е.П. Соколик, Н.В. Бухтиярова // Международный неврологический журнал. – 2009. – №1 (23). – С. 116–180.



7. Данилова Л.А. Довідник з лабораторних методів дослідження / Данилова Л.А. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
8. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. реком. ГФЦ МЗ Украины / Чекман И.С., Громов Л.А., Беленичев И.Ф. и др. – К., 2010. – 83 с.
9. Пат. № 13132 (Украина) / Ю.М. Колесник, И.Ф. Беленичев, А.В. Абрамов, С.В. Павлов, – МПК JOIN 33/48, (UA), №200509119 (2005).
10. Королюк М.А. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело – 1998. – №1.
11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – №11.
12. Горбунов Н.В. Влияние структурной модификации мембранных белков на липид-белковое взаимодействие в мембранах эритроцитов человека / Н.В. Горбунов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – №7.
13. Беленичев И.Ф. Сравнительная оценка энергомодулирующего действия цереброфурина, кортексина и церебролизина при хронической алкогольной интоксикации / И.Ф. Беленичев, Е.П. Соколик // Патологія. – 2010. – Т. 7, №2. – С. 50–53.
14. Беленичев И.Ф. Современные подходы к терапии острого нарушения мозгового кровообращения / И.Ф. Беленичев, Н.В. Бухтиярова, Д.А. Серeda // Новости медицины и фармации. – 2008. – №5 (237). – С. 1–7.
15. Беленичев И.Ф. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, В.И. Черний, Ю.М. Колесник – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262с.
16. Беленичев И.Ф. Фундаментальные проблемы фармакологии / И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, Н.А. Волошин, С.И. Коваленко // Сб. трудов 2-го съезда Рос. научного общества фармакологов. – М., 2003. – С. 63–64.

Сведения об авторах:

Егоров А.Н., аспирант каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Беленичев И.Ф., д. биол. н., профессор, зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Соколик Е.П., ассистент каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.

Кучеренко Л.И., д. фарм. н., доцент, зав. каф. фармацевтической химии ЗГМУ.

Поступила в редакцию 07.06.2012 г.