

О. М. Єгоров, І. Ф. Бєленічев, О. П. Соколик, А. В. Абрамов

Вплив цереброкуруину і тіоцетаму на ранню відповідь геному та морфофункціональний стан нейронів CA-1 зони гіпокампа щурів за умов пренатальної алкоголізації

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: пренатальна алкоголізація, тіоцетам, цереброкуруин, ген раннього реагування *c-fos*, CA-1 зона гіпокампа

Актуальність жіночого алкоголізму зумовлена тим, що, у першу чергу, наноситься шкода стану здоров'я дітей, народжених від даного контингенту жінок. В організмі плода на тлі неминучих явищ алкогольної інтоксикації та інших нейроімуноендокринних порушень спостерігаються дистрофічні явища, відставання в рості та розвитку, виникають серйозні порушення мозкового кровообігу, що призводять до стійких порушень енергетичного метаболізму нервової тканини, глутаматної ексайтотоксичності, оксидативного стресу, апоптозу та загибелі нейронів. Важливу роль у цьому відіграють так звані «ранні гени» сімейств *c-fos* [1]. Згодом у дітей виявляється зниження інтелекту, відставання в психомоторному розвитку, симптоми вегетосудинної дистонії з дихальними порушеннями та інші патології [2–4]. Новонароджені від матерів, що зловживали алкоголем, відрізняються різноманітними клініко-метаболическими, імунологічними, гормональними розладами адаптації до позаутробного життя, високою частотою інфекційних захворювань, суттєвими психоневрологічними порушеннями та відхиленнями розвитку в наступні роки життя. Останнім часом особливий інтерес у лікуванні наслідків пренатального алкоголізму (ПА) викликають препарати з вираженими ноотропними та нейропротективними властивостями (пірацетам, солі янтарної кислоти, мексидол). Нашими дослідженнями показана ефективність тіо-

цетаму та цереброкуруину за умов хронічної алкоголізації, спрямована на зменшення порушень когнітивно-мнестичних функцій ЦНС [5]. Проте їхній вплив на морфофункціональний стан нейронів та відповідь геному за пренатальної алкоголізації (ПА) досконало не вивчений, та відсутнє достовірне експериментальне обґрунтування. *Мета дослідження* – оцінка ефективності призначення тіоцетаму та цереброкуруину тваринам, які перенесли ПА, за результатами впливу препаратів на характер експресії генів ранньої відповіді та морфофункціональні показники нейронів.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на самках білих щурів масою 60–70 г, що отримані із ПП «Біомодельсервіс». Щури з 5-го по 20-й день вагітності отримували етанол у дозі 6–8 г/кг щоденно, контрольні щури – ізокалоричний розчин сахарози. Нащадкам алкоголізованих щурів протягом 25 днів внутрішньочеревинно вводили тіоцетам (125 мг/кг), пірацетам (125 мг/кг) або цереброкуруин (0,05 мл/кг), контрольна група тварин отримувала фізіологічний розчин. У кожній групі було по 20 новонароджених.

Для морфологічних та гістоімунохімічних досліджень тканину головного мозку експериментальних тварин поміщали на добу у фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парапласт X-TRA, після чого на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи відділів головного мозку, що вивчали, завтовшки 5 мкм (для морфометричних досліджень) і 15 мкм (для гістоімунохімічних досліджень) [6].

Для вивчення морфології нейронів та гліоцитів зрізи фарбували з метою визначення нуклеїнових кислот галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном.

Визначали наступні показники:

- щільність нейронів, гліальних клітин, апоптотично та деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу);
- клітинний склад СА-1 зони кори гіпокампа (у відсотках);
- площу тіл нейронів, гліальних клітин, апоптотично та деструктивно змінених нейронів (мкм²);
- концентрацію РНК у нейронах, гліальних клітинах, апоптотично та деструктивно змінених нейронах, які розраховували як логарифм співвідношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини;
- уміст РНК у нейронах, гліальних клітинах (одиниці оптичної щільності, E_{оп}), які розраховують як добуток концентрації РНК і площі клітин [7].

Для гістохімічного дослідження використовували метод непрямої імуофлюоресценції. На першому етапі на зрізи наносили первинні антитіла щодо досліджуваного білка та інкубували при 4 °С 24 год. Після інкубації зрізи тричі промивали 0,1 М фосфатним буфером, після чого на зразки наносили вторинні антитіла (флюоресцент кон'югований козячий IgG, Sigma Chemical, USA) та інкубували при кімнатній температурі 60 хв. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером. На флуоресцентному мікроскопі досліджували c-fos імунопозитивні клітини.

Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць пов'язаності. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартної помилки репрезентативності середнього значення. Взаємозв'язок між досліджуваними змінними проводили, використовуючи процедуру бінарного регресійного аналізу. Результати дослідження обробляли із застосуванням статистичного пакета програми «SPSS 16», «Microsoft

Excel 2003», «STATISTICA® for Windows 7.0» (StatSoft Inc.). Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при рівнях значущості менше 0,05.

Результати та їх обговорення. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено, що моделювання ПА призводило до значної зміни відповіді геному, що проявлялося порушенням експресії гена раннього реагування c-fos. Як видно з таблиці 1, на 25 добу життя в щурів із ПА було зареєстровано значне зменшення кількості c-fos-позитивних клітин більш ніж на 55 % відносно групи інтактних тварин. Зміни експресії генів раннього реагування, «третинних месенджерів» (гена c-fos, гена c-jun, гена krox-20, гена zif/268 та ін.) можна розцінювати як неспецифічну реакцію геному на будь-який шкідливий вплив, у тому числі на ішемію [8]. Відомо, що білки fos-, jun- і krox-генних сімейств відіграють вирішальну роль у контролі за клітинним циклом, розвитком, ростом і клітинним розділенням, а також визначають долю диференційованих нейронів [8]. Експресія генів призводить до синтезу ДНК-зв'язаних протеїнів, факторів транскрипції та, у свою чергу, викликають експресію інших генів раннього реагування. Таким чином, гени раннього реагування беруть участь у передачі інформації від клітини до клітини. Цікаво, що транскрипційні фактори можуть бути медіаторами як нейрональної смерті, так і виживання клітин [8, 9].

Зміни відповіді геному за умов моделювання пренатальної алкоголізації супроводжувалися порушеннями морфофункціонального стану як нейронів СА-1 зони гіпокампа, так і гліальних клітин.

Так, на 25 добу життя пренатально алкоголізованих щурів спостерігалось падіння щільності й площі нейронів (на 16 % та 15,8 %) і гліоцитів (у середньому на 5 % та 5,5 %) відповідно відносно показників інтактних тварин (табл. 2 та 3). Крім того, було відзначено падіння транскрипційної активності нейроцитів і глії, що виражалося поступовим зниженням кон-

Таблиця 1

Вплив досліджуваних препаратів на експресію генів раннього реагування (c-fos) за щільністю Fos-позитивних нейронів СА-1 зони гіпокампа пренатально алкоголізованих щурів на 25 добу життя, $M \pm m$

Група тварин	Щільність Fos-позитивних нейронів, клітини/мм ²
Інтактні тварини	83,4±4,7
Контроль (ПА)	37,1±2,0
ПА+цереброкурин	86,5±4,7*#
ПА+тіоцетам	77,1±3,2*#
ПА+пірацетам	41,3±3,4

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: * $P \leq 0,05$ відносно контролю; # $P \leq 0,05$ відносно групи тварин, що отримували пірацетам.

Таблиця 2

Характеристика нейронів СА-1 зони гіпокампа головного мозку пренатально алкоголізованих щурів на 25 добу після народження, $M \pm m$

Група тварин	Щільність нейронів, клітини/мм ²	Площа тіл нейронів, мкм ²	Уміст РНК у нейронах, $E_{оп}$
Інтактні тварини	1 478 ± 37	63,11 ± 1,07	10,63 ± 0,31
Контроль (ПА)	1 241 ± 31	53,21 ± 1,40	8,03 ± 0,32
ПА+цереброкурин	1 402 ± 24*#	63,11 ± 1,11*	15,11 ± 0,24*#
ПА+тіоцетам	1 398 ± 17*#	61,23 ± 1,43*	12,83 ± 0,11*#
ПА+пірацетам	1 258 ± 38	56,46 ± 0,70	8,17 ± 0,14

Таблиця 3

Характеристика гліальних клітин СА-1 зони гіпокампа головного мозку пренатально алкоголізованих щурів на 25 добу після народження, $M \pm m$

Група тварин	Щільність гліальних клітин, клітини/мм ²	Площа тіл гліальних клітин, мкм ²	Уміст РНК у гліальних клітинах, $E_{оп}$
Інтактні тварини	441 ± 15	21,80 ± 0,11	3,86 ± 0,02
Контроль (ПА)	420 ± 11	23,30 ± 0,15	2,44 ± 0,02
ПА+цереброкурин	437 ± 17*	23,70 ± 0,12*	4,12 ± 0,03*
ПА+тіоцетам	440 ± 15*	24,10 ± 0,10*	3,92 ± 0,02*
ПА+пірацетам	421 ± 21	21,70 ± 0,20	2,61 ± 0,01*

центрації РНК в ядрі. Морфометричне вивчення головного мозку щурів, що пренатально отримували етиловий алкоголь, показало в них достовірне зниження щільності нейронів СА-1 зони гіпокампа порівняно зі здоровими новонародженими на 25 добу життя. При цьому відмічалось зменшення площі тіл нейронів зі зниженням у них умісту РНК порівняно зі здоровими новонародженими. ПА суттєво не впливала на щільність гліальних клітин у гіпокампі щурят, але викликала достовірне збільшення площі гліоцитів зі зменшенням у них умісту РНК.

Призначення новонародженим, які перенесли ПА, тіоцетаму та церебро-

куруну протягом 25 діб мало рівнозначний за силою дії нейропротективний вплив, який виражався в збільшенні щільності та площі нейронів і збільшенні вмісту РНК (підвищення морфофункціональної активності нейронів). Нейропротективна дія тіоцетаму проявлялася й відносно нейроглії за рахунок підвищення, практично до рівня здорових тварин, щільності гліальних клітин та їх морфофункціональної активності (збільшення РНК). Ці дані узгоджуються з результатами гістоімунохімічних досліджень, якими показано позитивний вплив тіоцетаму на транскрипційну активність нейронів гіпокампа новонароджених щурів. Уведення цере-

брокуруину також мало позитивну дію відносно нейроглії.

Уведення за такою самою схемою пірацетаму не справляло подібного достовірного нейропротективного ефекту.

Стосовно тіоцетаму можна припустити, що тіолові групи препарату конкурують з SH-групами цистеїнзалежної ділянки АТФ/АДФ-антипортеру, білка внутрішньої мембрани мітохондрій за активні форми кисню та пероксинітрид, утворюючи з останніми стійкі комплекси. Цей процес має захисний вплив на мембрани нейронів і тим самим гальмує нейродеструкцію [10].

Цереброкурин продемонстрував здатність нормалізувати експресію гена *c-fos*. Даний ефект препарату є одним з головних у його церебропротективній дії – за рахунок посилення експресії гена *c-fos* змінювався морфологічний тип загибелі нейронів, переключаючись на більш «м'який» апоптотичний шлях. Апоптотична загибель нейронів є оптимальним, упорядкованим процесом припинення життєдіяльності деструктивно змінених нейронів, при якому стабілізуються клітинні мембрани, уміст клітин утилізується шляхом утворення апоптотичних

тілець і їхнього фагоцитозу, без розвитку запальної реакції. Слід зазначити, що введення цереброкуруину не призводило до гіперекспресії генів, а лише до нормалізації [11].

Висновки

1. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено, що за умов ПА відбувалася значна загибель нейронів та гліоцитів у СА-1 зоні гіпокампа щурів на тлі пригнічення транскрипційної та трансляційної активності, що проявилось в порушенні експресії генів раннього реагування, зменшенні вмісту РНК у нейронах та глії.
2. Призначення щурам, які перенесли ПА, тіоцетаму та цереброкуруину протягом 25 діб мало рівнонаправлену нейропротективну дію при лідерстві цереброкуруину, що виражалось в зменшенні нейрональної загибелі, підвищенні трофічної функції глії та активації експресії субтотального фактора транскрипції раннього реагування *c-fos*.
3. Уведення за такою самою схемою пірацетаму не призводило до подібного нейропротективного ефекту.

1. Ethanol preference in maudsley and RXNRA recombinant inbred strains of rat / Adams N., Oldham T. D., Briscoe J. T. [et al.] // *Alcohol* – 2001. – V. 24, № 1. – P. 25–34.
2. Барашнев Ю. И. Перинатальная неврология / Ю. И. Барашнев. – М.: Триада-Х, 2001. – 638 с.
3. Бурдули Г. М. Репродуктивные потери (причины, факторы риска, пути профилактики: Автореф. дис. докт. мед. наук / Г. М. Бурдули. – М., 1998. – 47 с.
4. Медведев М. В. Задержка внутриутробного развития плода / М. В. Медведев, Е. В. Юдина. – М., 1998. – 208 с.
5. Беленичев И. Ф. Фармакологічна модуляція сигналіngu апоптозу нейронів СА1-зони гіпокампа щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією / І. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, О. П. Соколик // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2011. – № 6. – С. 15–21.
6. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: пер. с англ. / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
7. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. – М.: Мир, 1962. – 962 с.
8. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses / Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A. [et al.] // *Hippocampus*. – 2006. – V. 16, № 10. – P. 814–25.
9. Aird F. Ontogeny of hypothalamic corticotropin-releasing factor and anterior pituitary proopiomelanocortin expression in male and female offspring of alcohol exposed and adrenalectomized dams / Aird F., Halasz I., Redei E. // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 1997. – V. 21, № 9. – P. 1560–1566.
10. Chronic ethanol consumption and withdrawal affects mitochondrial benzodiazepine receptors in rat brain and peripheral organs / Bidder M., Weizman R., Fares F. [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – V. 44, № 7. – P. 1335–1339.
11. Guerri C. Alcohol, astroglia, and brain development / Guerri C., Renaupiqueras J. // *Mol. Neurobiol.* – 1997. – V. 15, № 1. – P. 65–81.

А. Н. Егоров, И. Ф. Беленичев, Е. П. Соколик, А. В. Абрамов
Влияние цереброкурина и тиоцетама на ранний ответ генома
и морфофункциональное состояние нейронов СА-1 зоны
гиппокампа крыс в условиях пренатальной алкоголизации

Проведенными экспериментальными исследованиями установлено, что пренатальная алкоголизация крыс приводила к изменению ответа генома, проявляющегося нарушением экспрессии генов раннего реагирования *c-fos*, уменьшением плотности и площади нейронов и глиальных клеток СА-1 зоны гиппокампа, а также уменьшением содержания в них РНК. 25-дневное курсовое введение новорожденным, которые перенесли пренатальную алкоголизацию, тиоцетама и цереброкурина оказывало равнонаправленный нейропротективный эффект, который выражался в увеличении плотности и площади нейронов в СА-1 зоне гиппокампа, а также содержания в них РНК. Введение по такой же схеме пирецетама не оказало подобного нейропротективного эффекта.

Ключевые слова: пренатальная алкоголизация, тиоцетам, цереброкурин, ген раннего реагирования *c-fos*, СА-1 зона гиппокампа

A. N. Egorov, I. F. Belenichev, E. P. Sokolik, A. V. Abramov
The impact of cerebrocurin and tiocetam on the early response of the genome
and morphofunctional state of neurons from CA-1 zone of the hippocampus
of rats under prenatal alcoholization

There were established that prenatal alcoholization of rats caused significant changes in the response of the genome, which is manifested in the violation of the genes early response *c-fos* expression, decrease of density and area of neurons and glial cells from the CA-1 zone of the hippocampus and also their RNA contents. 25-days course administration of tiocetam to the newborn rats who were undergone to prenatal alcoholization caused the same neuroprotective effect (increase of the density and the square of neurons as well as RNA content) as cerebrocurin did. Introduction of piracetam according to the same scheme did not show such a reliable neuroprotective effect.

Key words: prenatal alcoholization, tiocetam, cerebrocurin, gene of early response *c-fos*, CA-1 zone of the hippocampus

Надійшла: 27. 06.2012 р.

Контактна особа: Беленічев Ігор Федорович, професор, докт. біол. наук, завідувач кафедри фармакології і лікарської рецептури, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035. Тел: (612) 24-64-69. E-mail: olybelenicheva@mail.ru