

гностическим признаком развития деструктивных осложнений при санации полости рта у больных, которым проводится химиолучевая терапия.

2. Всем больным с местно-распространенным раком слизистой полости рта целесообразно определение прогностического индекса развития осложнений при любых стоматологических манипуляциях.

3. Оценку вероятности развития указанных осложнений с коррекцией профилактических и лечебных мероприятий необходимо осуществлять в зависимости от величины прогностического индекса.

4. Проведение профилактических мероприятий развития осложнений при санации полости рта у онкологических больных после комбинированного и комплексного лечения позволяет снизить количество геморрагических осложнений до 5,0%, а локальных воспалительных процессов – до 2,8%.

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2002. М.: ММА, 2004. 254 с.

2. Химиолучевое лечение больных с местно-распространенным раком органов полости рта и ротоглотки / Карасева В.В. [и др.] // «Российская онкология». 2000. №4. С. 21–23.

3. Эпидемиология рака слизистой оболочки полости рта и состояние онкологической помощи населению с данной патологией в Российской Федерации / Подвизников С.О. [и др.] // Материалы научн. конф. «Современные методы диагностики и лечения рака слизистой оболочки полости рта», Самара - М., 2011. С. 42.

4. Late toxicities due to multimodal treatment of head and neck cancer (HNC) / Buentzel J. [et al] // Radiotherapy and oncology. 2004. Vol. 73(1). P. 716.

5. Effects of lapatinibmonotherapy: result of a randomized phase II study in therapy-naive patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck / Del Campo J.M. [et al] // Br. J. Cancer. 2011. Vol.105(5). P.618–627.

6. Treatment results of postoperative radiotherapy on squamous cell carcinoma of the oral cavity: coexistence of multiple minor risk factors results in higher rates / Fan E.I. [et al] // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2010. Vol. 77(4). P.1024–1029.

7. Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs accelerated hyperfractionated radiotherapy vs concomitant radiotherapy and chemotherapy - a multicenter randomized trial. Update at 5 years / Falli C. [et al] // Radiotherapy and oncology. 2004. Vol.73(1). P. 676.

8. Phase II trial of induction chemotherapy followed by surgery for squamous cell carcinoma of the oral tongue in

young adults / Kies M.S. [et al] // Head Neck. 2012. Vol. 34(9). P. 1255–1262.

9. Preoperative concurrent chemoradiotherapy for stages II-IV oral squamous cell carcinoma: a retrospective analysis and future possibility of this treatment strategy / Kirita T. [et al] // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012. Vol. 41(4). P. 241–248.

10. Ord R.A. Surgical management of the N0 neck in early stage T1-2 oral cancer; a personal perspective of early and palpable disease // Oral Maxillofac. Surg. 2012. Vol.16(2). P. 181–188.

References

1. Davydov MI, Aksel' EM. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii i stranakh SNG v 2002. Moscow: MMA; 2004. Russian.

2. Karaseva VV, et al. Khimioluchevoe lechenie bol'nykh s mestno-rasprostranennym rakom organov polosti rta i rotoglotki. «Rossiyskaya onkologiya». 2000;4:21-3. Russian.

3. Podvyaznikov SO, et al. Epidemiologiya raka slizistoy obolochki polosti rta i sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu s dannoy patologiyey v Rossiyskoy Federatsii. Materialy nauchn. konf. «Sovremennye metody diagnostiki i lecheniya raka slizistoy obolochki polosti rta»; Samara – Moscow; 2011. Russian.

4. Buentzel J, et al. Late toxicities due to multimodal treatment of head and neck cancer (HNC). Radiotherapy and oncology. 2004;73(1):716.

5. Del Campo JM, et al Effects of lapatinibmonotherapy: result of a randomized phase II study in therapy-naive patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Br. J. Cancer. 2011;105(5):618-27.

6. Fan EI, et al. Treatment results of postoperative radiotherapy on squamous cell carcinoma of the oral cavity: coexistence of multiple minor risk factors results in higher rates. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2010;77(4):1024-9.

7. Falli C, et al. Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs accelerated hyperfractionated radiotherapy vs concomitant radiotherapy and chemotherapy – a multicenter randomized trial. Update at 5 years. Radiotherapy and oncology. 2004;73(1):676.

8. Kies MS, et al. Phase II trial of induction chemotherapy followed by surgery for squamous cell carcinoma of the oral tongue in young adults. Head Neck. 2012;34(9):1255-62.

9. Kirita T, et al. Preoperative concurrent chemoradiotherapy for stages II-IV oral squamous cell carcinoma: a retrospective analysis and future possibility of this treatment strategy. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012;41(4):241-8.

10. Ord RA. Surgical management of the N0 neck in early stage T1-2 oral cancer; a personal perspective of early and palpable disease. Oral Maxillofac. Surg. 2012;16(2):181-8.

УДК: 615.214.31:616.89

DOI: 10.12737/5906

НИТРОЗИРУЮЩИЙ СТРЕСС И АПОПТОЗ НЕЙРОНОВ СА1-ЗОНЫ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ: НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТИОЦЕТАМА

И.Ф. БЕЛЕНИЧЕВ, Т.В. КУЧЕР, Л.И. КУЧЕРЕНКО, С.А. МОРГУНЦОВА

Запорожский государственный медицинский университет, пр. Маяковского, 26, Запорожье, Украина, 69035, e-mail: ifb1914@mail.ru

Аннотация. В результате проведенных исследований установлено, что моделирование хронической алкогольной интоксикации ежедневным внутрижелудочным введением беспородным белым крысам-самцам этанола по схеме (первые 10 дней 15% раствор этанола в дозе 4 г/кг, затем 10 дней – 15% раствор этанола в дозе 6 г/кг, затем 10 дней – 25% раствор этанола в дозе 4 г/кг) приводит к активации реакций нитрозирующего стресса и инициированию нейроапоптоза. Так, в мозге

животных после хронического введения этанола выявлено значительное повышение по сравнению с группой здоровых животных маркера нитрозирующего стресса- нитротирозина в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената мозга на фоне выявления молекулярных маркеров апоптоза в нейронах СА1-зоны гиппокампа (фрагментация ядер нейронов СА-1 зоны гиппокампа, повышение плотности и процента апоптотически и деструктивно измененных клеток), а также депривации антиапоптотических механизмов (уменьшение плотности bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа, и снижение концентрации bcl-2 белка в гиппокампе). Курсовое назначение животным в течение 14 суток после хронической алкоголизации комбинированного нейрометаболического церебропротектора «Тиоцетам» в дозе 100 мг/кг внутривенно оказывало достоверное защитное действие в отношении нейронов СА1-зоны гиппокампа. Так, назначение тиоцетама приводило к снижению уровня нитротирозина как в митохондриях, так и цитозоле мозга животных с хронической алкоголизацией по сравнению с группой нелеченных животных и с группой, которой вводили пирацетам. Введение тиоцетама экспериментальным животным приводило к достоверному снижению плотности апоптотических и деструктивно измененных нейронов СА-1 зоны гиппокампа и процента апоптотически измененных клеток по сравнению с группой контроля и группой животных, получавших курсом пирацетам. Курсовое назначение тиоцетама достоверно повышало плотность Bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа и достоверно повышало концентрацию Bcl-2 в тканях мозга экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей по такой же схеме пирацетам. Повышение экспрессии белка Bcl-2 в группе животных, получавших тиоцетам, свидетельствует об активации антиапоптотической защиты поврежденных нейронов под действием этого препарата. Мы предполагаем, что один из молекулярных механизмов нейропротективного действия тиоцетама в условиях хронической интоксикации является прерывание NO-зависимых механизмов нейроапоптоза.

Ключевые слова: тиоцетам, пирацетам, хронический алкоголизм, нейроапоптоз, гиппокамп, нитрозирующий стресс.

NITROSORBIDI STRESS AND APOPTOSIS OF NEURONS IN THE CA1 ZONE OF THE HIPPOCAMPUS IN THE CONDITIONS OF MODELING CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION: NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF TIETEMA

I.F.BELNICHEV, T.V.KUCHER, L.I.KUCHERENKO, S.A.MORGUNTSOVA

Zaporozhye State Medical University, Mayakovsky av., 35, Zaporozhye, Ukraine, 69035, e-mail: Ifb1914@mail.ru

Abstract. Fulfilled researches showed that modeling of chronic alcohol intoxication by daily intragastric ethanol administration to non-pedigreed male white rats (first 10 days – 15% ethanol solution in dose 4 g/kg, next 10 days – 15% ethanol solution in dose 6 g/kg, then 10 days – 25% ethanol solution in dose 4 g/kg) leads to activation of nitrosorbidi stress reactions and initiation of neuro-apoptosis. Thus, as compared with healthy animals group, in rats' brain after chronic ethanol administration it was revealed significant increase of nitro-tyrosine (nitrosorbidi stress marker) in cytosolic and mitochondrial fractions of brain homogenate against the background of revealing of apoptosis molecular markers in hippocampal CA1 zone neurons (fragmentation of neuron's nuclei of hippocampal CA1 zone, increase of density and ratio of apoptotic- and destructive-changed cells) as well as deprivation of anti-apoptotic mechanisms (decrease of density of Bcl-2-positive neurons in hippocampal CA1 zone and decrease of Bcl-2 protein concentration in hippocampus). Subsequent 14-day intragastric administration of complex neuro-metabolic cerebro-protector Thiocetam in dose 100 mg/kg to the animals after chronic alcoholization showed significant protective effect on hippocampal CA1 zone neurons. Thus, Thiocetam administration resulted in decrease of nitrotyrosine levels in mitochondrion and in cytosol of brain of animals with chronic alcoholization as compared with untreated animals and with animals receiving Piracetam. Thiocetam administration to experimental animals led to significant decrease of density of apoptotic- and destructive-changed neurons of hippocampal CA1 zone and ratio of apoptotic-changed cells as compared with control group and animals receiving Piracetam. Course of treatment with Thiocetam increases significantly the density of Bcl-2-positive neurons in CA1 zone of hippocampus and significantly increases concentration of Bcl-2 in brain tissue of experimental animals as compared with control group and animals which received Piracetam according the same schedule. The increase of Bcl-2 protein expression in animals received Thiocetam testifies to the activation of anti-apoptotic defense of damaged neurons under the influence of this preparation. We suppose that one of the molecular mechanisms of neuro-protective effect of Thiocetam in chronic intoxication is the breaking of NO-depended mechanisms of neuro-apoptosis.

Key words: Thiocetam, Piracetam, chronic alcoholism, neuro-apoptosis, hippocampus, nitrosorbidi stress.

Алкоголизм – одна из актуальнейших социальных и медицинских проблем, стоящих перед современным обществом. В последние десятилетия в большинстве стран мира наблюдается неуклонный рост производства и потребления спиртных напитков, что вызывает глубокую озабоченность и тревогу у многих известных ученых и государственных деятелей. Возросшая доступность алкогольных напитков и снисходительное или пассивное отношение многих государств к проблеме алкоголизма привели к распространению этой болезни среди населения, особенно среди молодых людей и женщин [2,5,14]. Систематическое употребление алкоголя, даже в малых дозах, является предпосылкой возникновения и прогрессирования заболеваний всех внутренних органов, особенно чувствительна к алкоголю нервная система. Установлено, что под действием алкоголя в тканях головного мозга отмечается выраженная гиперемия,

расширение мельчайших капилляров, дистрофические изменения глиозных клеток в коре, аммониевом роге, подкорковых образованиях, гибель клеток мозжечка. Данные обстоятельства определяют особую актуальность дальнейшего исследования биохимических, молекулярных аспектов патогенеза алкоголизма, а также поиск новых высокоэффективных церебропротекторных веществ в качестве нейрометаболического церебропротектора комбинированный препарат Тиоцетам [1,2,5,8,9]. Тиоцетам улучшает лекарственных препаратов для комплексного лечения алкоголизма [1,2,8,12]. С 2003 г. в Украине, а позже и в России, нашел прим энергетический метаболизм, тормозит реакции оксидативного стресса, улучшает когнитивно-мнестические функции головного мозга после мозговых инсультов, ЧМТ, гипоксической энцефалопатии [1,2,3,14]. Вышеизложенное явилось теоретическим обоснованием для эксперименталь-

ной оценки нейропротективного действия тиоцетама в условиях хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования. В опытах использовали 40 белых беспородных крыс-самцов с массой тела 180-220 г. и возрастом 4,5 месяцев, которые содержались в виварии при свободном доступе к пище (стандартный гранулированный корм) и воды, при естественной смене дня и ночи; животные получены из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины». Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с «Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях» [4].

Хроническую алкогольную интоксикацию (ХАИ) вызывали ежедневным внутрижелудочным введением первые 10 дней 15% раствора этанола в дозе 4 г/кг, следующие 10 дней – 15% раствора этанола в дозе 6 г/кг, и последующие 10 дней крысам вводили 25% раствор этанола в дозе 4 г/кг. С 30 суток прекращали алкоголизацию и проводили экспериментальную терапию изучаемыми препаратами, продолжали наблюдение в течение 14 дней. Все крысы разделены на 4 группы по 10 животных в каждой:

1 группа получала в течение 30 дней этанол и с 31 по 44 сутки – Тиоцетам внутрижелудочно с помощью металлического зонда в дозе 100 мг/кг;

2 группа получала в течение 30 дней этанол и с 31 по 44 сутки – пирацетам; внутрижелудочно с помощью металлического зонда в дозе 250 мг/кг 3 группа получала в течение 30 дней этанола (контроль);

4 группа – интакт (вместо этанола получала физиологический раствор).

Биохимические исследования головного мозга проводили на 45 сутки эксперимента, с этой целью животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга проводили методом дифференциального центрифугирования методом Мак-Ильвейна и Роднайт.

Для иммуноферментных исследований ткань головного мозга гомогенизировалась на холоде в солевой изотонической среде (0,15M KCl) при температуре +4°C с помощью стеклянного гомогенизатора в соотношении ткань – солевой раствор 1:20 [4]. Затем при температуре +4°C методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) выделяли цитозольную и митохондриальную фракции. В митохондриальной и цитозольной фракциях головного мозга определяли содержание нитротирозина с помощью ELISA-набора NITROTYROSINE фирмы HBT, который представляет собой твердофазный энзим-связывающий иммуносорбентный набор, работающий по принципу «сэндвича». Для морфологических и гистохимических исследований ткань головного мозга экспериментальных животных помещали на сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парапласт X-TRA, после чего на ротационном микротоме изготавливали срезы изучаемых отделов головного мозга толщиной 5 микрон (для морфометрических исследований) и 15 микрон (для гистохимических исследований) [4,7].

Для изучения морфологии нейронов и глиоцитов срезы окрашивали для определения нуклеиновых кислот галлюцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону.

Определяли следующие показатели:

- плотность апоптотических и деструктивно измененных нейронов как количество клеток на 1мм² площади среза;
- клеточный состав СА-1 зоны гиппокампа в процен-

тах [10].

Для гистоиммунохимического исследования использовали метод непрямой иммунофлюоресценции. Для определения интенсивности экспрессии антиапоптотического белка bcl-2 гистологические срезы выделяли из парапласта и регидрировали, трижды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (pH=7,4) и в течение 30 минут инкубировали с 2н соляной кислотой (T=37°C). Затем в течение 24 часов инкубировали во влажной камере (T=4-6°C) с первичными поликлональными антителами кроликов IgG (1:500) bcl-2 производства Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). После инкубации срезы четырежды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (pH=7,4), затем в течение 1 часа (T=37°C) инкубировали с вторичными антителами козы к фрагменту IgG мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем (FITC) фирмы Sigma-Aldrich (кат.№ F2266). После заключительной четырехкратной отмывки фосфатным буфером (pH=7,4) срезы заключали в смесь глицерин-фосфатный буфер (9:1). На флуоресцентном микроскопе Axioskop (Zeiss, Germany) определяли интенсивность экспрессии bcl-2 по плотности bcl-2-позитивных клеток в срезах с помощью видеокамеры COHU – 4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS –386 (Kontron Electronic, Germany).

Кроме этого, определяли количественное содержание bcl-2 белков методом иммуноблоттинга. С этой целью проводилось выделение нейронов коры мозга в два этапа [4]. На первом этапе мозговая ткань дезинтегрировалась с целью получения клеточной суспензии, на втором – осуществлялось 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 Трис-НСl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % Тритона X-100, 2 mM EDTA и 1 mM PMSF (производство Sigma, США). Экстракт центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию общего белка по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (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 ± стандартная ошибка среднего значения. Достоверность отличий между экспериментальными группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% (p<0,05). Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., № AXX R712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований было установлено, что ХАИ приводит к инициированию нитрозирующего стресса в мозге экспериментальных животных, о чем свидетельствовало повышение нитротирозина в цитозоле и митохондриях на 332% и 361% соответственно в группе контроля по сравнению с группой здоровых животных (интакт) (табл. 1).

Известно, что при повреждении нейронов головного

мозга на фоне хронической алкогольной интоксикации важную роль играет система оксида азота. Цитотоксические дериваты NO (пероксинит и ион нитрозония) модифицируют (нитрозируют или гидроксидируют) антиапоптотические белки, в частности bcl-2, снижая их функции, и усиливают синтез проапоптотических белков FAS и APO-1 [6,12]. Повышенная концентрация NO, а также пероксинит усиливает экспрессию каспаз, которые относятся к семейству IL-1 β -конвертирующих протеаз, причастных к разветвлению цепи апоптоза [1,15,18].

Таблица 1

Влияние тиоцетама на содержание маркера нитрозирующего стресса -нитротирозина в головном мозге животных с ХАИ

Экспериментальные группы	Нитротирозин в цитозольной фракции головного мозга, нмоль/г белка	Нитротирозин в митохондриальной фракции головного мозга, нмоль/г белка
Интактная	27,1 \pm 0,35	7,2 \pm 0,6
Контрольная (ХАИ)	117,2 \pm 4,8	33,2 \pm 1,7
ХАИ+тиоцетам	50,1 \pm 3,2*#	12,8 \pm 1,4*#
ХАИ+пирацетам	105,0 \pm 10,5	30,4 \pm 3,1

Примечание: * – p \leq 0,05 по отношению к контролю;
– p \leq 0,05 по отношению к группе, которая получала пирацетам

Таблица 2

Влияние Тиоцетама на плотность Bcl-2-позитивных нейронов СА-1 зоны гиппокампа животных с ХАИ

Группы животных	Плотность Bcl-2-позитивных нейронов в 1 мм ²
Интактная	287,8 \pm 14,0
Контрольная (ХАИ)	92,2 \pm 10,1
ХАИ+тиоцетам	167,1 \pm 14,1*#
ХАИ+пирацетам	95,1 \pm 11,5

Примечание: * – p \leq 0,05 по отношению к контролю;
– p \leq 0,05 по отношению к группе, которая получала пирацетам

Проводимая экспериментальная терапия в течение 14 суток животных после ХАИ приводила к снижению уровня нитротирозина как в митохондриях, так и цитозоле мозга животных. Как видно из табл. 1, наибольшая депрессия этого маркера нитрозирующего стресса регистрировалась в группах, получавших тиоцетам в дозе 100 мг/кг (57% – цитозольная и 61,5% – митохондриальная фракции) по сравнению с группой нелеченных животных и с группой, которой вводили пирацетам. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими работами, в которых показана высокая антиоксидантная активность тиоцетама [1,5,6]. Подобный эффект Тиоцетама является одним из ключевых механизмов его нейропротективного действия, так как от соотношения внутриклеточных концентраций NO и АФК зависит характер действия этих соединений на процессы, связанные с регуляцией апоптоза в нейрональной клетке. По всей видимости, тиоцетам не благоприятствует условиям накопления пероксинитрита (ONOO⁻) в цитозоле и, особенно, в митохондриях нейронов, и тем самым тормозит NO-зависимые механизмы апоптоза, связанные с активацией киназы JNK, факторов p53 и Вах, высвобождением цитохрома С из митохондрий [1,10,13]. Так, гистоиммунохимические исследования показали, что у животных, перенесших ХАИ, плотность bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа была достоверно ниже, чем у крыс интактной группы (табл. 2).

В цитозольной фракции гомогената головного мозга животных после ХАИ методом иммуноблоттинга был выявлен дефицит антиапоптотического белка Bcl-2. Известно, что Bcl-2 защищает нейроны от гибели, вызванной активацией п NOS, повышением NO-ассоциированной нейроток-

сичности (появление избытка токсических дериватов NO) [6,10,11]. Многие клетки защищены сверхэкспрессией Bcl-2 от апоптоза, вызванного активацией iNOS [11,18,19]. Сверхэкспрессия Bcl-2 ведет к защите клеток от большинства апоптоз-индуцирующих агентов. Взаимодействие нитрозирующего стресса с членами суперсемейства Bcl-2 выражается также в том, что при действии избытка NO на клетку сильно понижается уровень внутриклеточного Bcl-2 белка, возможно, через каспаз-индуцированное расщепление или p53-зависимое подавление его экспрессии [10,13,16,17]. Проапоптотический эффект оксида азота выражается также в индуцируемом им повышении экспрессии проапоптотического белка Вах [15,18,19]. Морфометрические исследования выявили в СА-1 зоне гиппокампа животных, перенесших ПА, появление апоптотически и деструктивно измененных нейронов. Курсовое введение тиоцетама в течение 14 суток животным после ХАИ приводило к достоверному снижению плотности апоптотических и деструктивно измененных нейронов СА-1 зоны гиппокампа на 33% и процента апоптотически измененных клеток на 42% по сравнению с группой контроля и группой животных, получавших курс пирацетам (табл. 3).

Таблица 3

Влияние Тиоцетама на плотность апоптотически/деструктивно измененных нейронов СА-1 зоны гиппокампа животных с ХАИ

Экспериментальные группы	Плотность клеток на 1 мм ²	Процент апоптотически измененных клеток
Интактная	27,3 \pm 14,3	3,07 \pm 0,08
Контрольная (ХАИ)	181,6 \pm 38,1	27,6 \pm 0,45
ХАИ+тиоцетам	121,7 \pm 27,1*#	16,1 \pm 2,42*#
ХАИ+пирацетам	179,7 \pm 42,3	26,8 \pm 4,51

Примечание: * – p \leq 0,05 по отношению к контролю;
– p \leq 0,05 по отношению к группе, которая получала пирацетам

Таблица 4

Влияние Тиоцетама на экспрессию белка Bcl-2 в цитозольной фракции гомогената головного мозга животных с ХАИ

Группа животных	Общий белок, грамм	Площадь, мм ²	Оптическая концентрация, усл.ед.	Оптическое содержание, усл.ед.
Интактная	4,7 \pm 0,02	58,37 \pm 1,3	0,17 \pm 0,001	7,61 \pm 0,32
Контрольная (ХАИ)	4,9 \pm 0,01	57,22 \pm 1,1	0,03 \pm 0,01	0,91 \pm 0,07
ХАИ+тиоцетам	4,9 \pm 0,01	58,77 \pm 1,2	0,12 \pm 0,002*#	4,12 \pm 0,11*#
ХАИ+пирацетам	4,8 \pm 0,01	57,32 \pm 1,3	0,03 \pm 0,01	0,92 \pm 0,08

Примечание: * – p \leq 0,05 по отношению к контролю;
– p \leq 0,05 по отношению к группе, которая получала пирацетам

Курсовое назначение тиоцетама в течение 14-суток животным после ХАИ, достоверно повышало плотность Bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа на 81,5% по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей по такой же схеме пирацетам. Также нами было установлено, что курсовое введение тиоцетама достоверно повышает концентрацию Bcl-2 в тканях мозга экспериментальных животных. Повышение экспрессии белка Bcl-2 в группе животных, получавших тиоцетам, свидетельствует об активации антиапоптотической защиты поврежденных нейронов под действием этого препарата (табл. 4).

Повышение концентрации белка Bcl-2 в нейронах на фоне введения тиоцетама приводила к торможению NO-зависимых механизмов нейроапоптоза под действием хронически вводимого в организм этанола. Так, назначение тиоцетама снижало основные молекулярные маркеры нейроапоптоза (фрагментация ядер нейронов СА-1 зоны гиппокампа, уменьшение плотности и процента апоптотически

измененных клеток), параллельно увеличивая концентрацию антиапоптотического белка Bcl-2 на фоне снижения уровня нитротирозина. По выраженности влияния на эти показатели тиоцетам достоверно превосходил пирацетам.

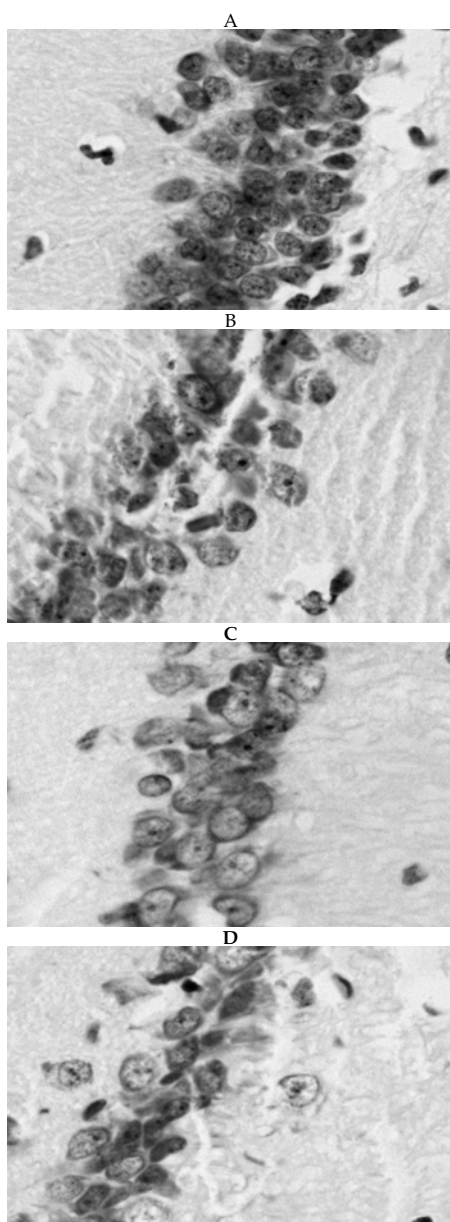


Рис. 1. Картина нейродегенерации после 30-дневной алкогольной интоксикации и последующего 14-дневного лечения (применялась окраска галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону, увеличение $\times 40$). А – СА-1 зона гиппокампа у животных группы интакта; В – СА-1 зона гиппокампа у животных контрольной группы; С – СА-1 зона гиппокампа у животных группы тиоцетама; D – СА-1 зона гиппокампа у животных группы пирацетама

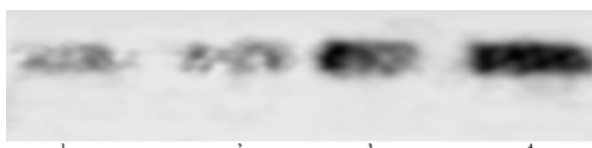


Рис. 2. Экспрессия белка Bcl-2 в головном мозге крыс (электрофореграмма). 1 – контроль; 2 – пирацетам; 3 – тиоцетам; 4 – интакт

Антиапоптотический механизм нейропротективного

действия тиоцетама обусловлен способностью его составляющего компонента (морфолина 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиоацетата) тормозить реакции нитрозирующего стресса. Так, морфолиний 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиоацетат (тиотриазаолин) нормализует сдвиги red-oxi-регуляции в условиях нитрозирующего стресса и предупреждает развитие нарушения равновесия тиосульфидной системы при гиперпродукции АФК и NO, обеспечивая такие функции, как передачу клеточного сигнала через рецепторно-ионноформный комплекс, сохраняя активность белков, ферментов, факторов транскрипции и антиапоптотических белков. [1,5,9,14]. Кроме того, тормозя окислительную инактивацию фактора транскрипции NF- κ B при избытке NO, тиоцетам усиливает активацию экспрессии редокс-чувствительных генов, которые необходимы для защиты клеток от токсических эффектов нитрозирующего стресса. Среди этих генов есть гены, ответственные за синтез супероксиддисмутазы и bcl-2 [1].

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что классик ноотропной терапии – пирацетам не подавляет нитрозирующий стресс и связанный с ним нейроапоптоз вследствие ХАИ. Назначение нейрометаболического церебропротектора тиоцетама в дозе 100 мг/кг в течение 14 суток животным после ХАИ приводит к торможению нейроапоптоза в СА1-зоне гиппокампа, возможно, за счет «утилизации» цитотоксических дериватов оксида азота и подавления нитрозирующего стресса. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием для клинического применения тиоцетама в комплексной нейропротекции при алкогольной болезни.

Литература

1. Беленичев И.Ф., Черный В.И., Колесник Ю.М. Рациональная нейропротекция. Донецк: Изд-ль Заславский А.Ю. 2009. 248 с.
2. Беленичев И.Ф., Павлов С.В., Соколик Е.П., Бухтиярова Н.В. Новые возможности лечения алкогольной болезни. Перспективы применения цереброкурина. Международный неврологический журнал. 2009. №1(29). С. 116–128.
3. Беленичев И.Ф., Фильянский Е.О., Павлов С.В., Бухтиярова Н.В., Кучеренко Л.И., Егоров А.Н. Влияние тиоцетама на показатели энергетического метаболизма и сопряженного с ним ГАМК-шунта в головном мозге потомства, рожденного от алкогользависимых матерей. Запорожский медицинский журнал. 2010. Том 12. №5. С. 127–130.
4. Беленичев И.Ф., Чекман И.С., Губский Ю.И. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов. Методические рекомендации Государственного Фармакологического Центра МЗ Украины. Киев, 2010. 81 с.
5. Беленичев И.Ф., Бухтиярова Н.В., Волков В.П. Фармакология: коллективная научная монография. Новосибирск: Изд. «СибАК», 2013. 194 с.
6. Беленичев И.Ф., Чекман И.С., Бухтиярова Н.В., Горбачева С.В. Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга. Журнал НАМН України. 2013. Т. 19. № 1. С. 3–11.
7. Герштейн Л.М., Корнева И.М., Рахманова В.И. Морфохимические особенности нейронов гиппокампа у крыс, различающихся по поведению. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. Т. 144. №12. С. 696–698.
8. Егоров А.Н., Беленичев И.Ф., Соколик Е.П. Состояние глутатионовой системы головного мозга пренатально

алкоголизованных крыс на фоне курсового назначения цереброкурина и тиоцетама // Фармакология и врачебная токсикология. 2012. №. 2(27). С. 36–39.

9. Мазур И.А., Волошин Н.А., Беленичев И.Ф. Тиотриазолин, тидарон в лечении сердечно-сосудистых патологий. Запорожье: Печатный Мир, 2012. 300 с.

10. Al-Moundhri M., Nirmala V., Al-Mawaly K. Al-Moundhri M. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer // *Pathol Oncol Res.* 2011. Vol. 9. №. 4. P. 226–231.

11. Bassik M.C. Exercise-induced Bcl-2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis // *Nature.* 2012. Vol.18. №.481(7382). P. 511–535.

12. Belenichev I.F., Sokolik E.P. Nitrozone stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides // *Inventi Rapid Molecular Pharmacology.* 2011. №4. P. 11–18.

13. Belenichev I.F., Sokolik E.P., Abramov A.V. Pharmacological modulation of apoptosis signaling in neurons of CA1-zone of hippocampus of rats with chronic alcohol intoxication // *Innovative Journal of Medical and Health Science.* 2011. Vol.1. №1. P. 12–16.

14. Belenichev I.F., Egorov A., Sokolik A. The impact of neurotrophic cerebroprotection on the expression of hsp70 in the brain of rats with prenatal chronic alcoholism // Conference: XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET Shanghai, China, May 20. 23. 2013. P.591

15. Ben-Neriah S. Concurrent expression of MYC and bcl-2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone // *J. Clin. Oncol.* 2012. Vol. 1. №30(28). P. 34–52

16. Boghaert E.R. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets // *Nat Med.* 2013. Vol.19. №2. P. 220–228.

17. Chertin B., Rolle U., Farkas H. The role of nitric oxide in reflux nephropathy // *Pediatr Surg Int.* 2009. Vol. 18. P. 630–634.

18. Chen R.M., Tai Y.T., Chen T.G., Lin T.H., Chang H.C., Chen T.L., Wu G.J. Chen R.M. Propofol protects against nitrosative stress-induced apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells via an intrinsic mitochondrial mechanism // *Surgery.* 2013. Vol.6. №1(154). P. 58–68.

19. Neelam A. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010. Vol.8. №1203. P. 1–6.

References

1. Belenichev IF, Cherniy VI, Kolesnik YuM. Ratsional'naya neyroproteksiya. Donetsk: Izd-l' Zaslavskiy A.Yu.; 2009. Russian.

2. Belenichev IF, Pavlov SV, Sokolik EP, Bukhtiyarova NV. Novye vozmozhnosti lecheniya alkohol'noy bolezni. Perspektivy primeneniya tserebrokurina. Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal. 2009;1(29):116-28.

3. Belenichev IF, Fil'yanskiy EO, Pavlov SV, Bukhtiyarova NV, Kucherenko LI, Egorov AN. Vliyanie tiotsetama na pokazateli energeticheskogo metabolizma i sopryazhennogo s nim GAMK-shunta v golovnom mozge potomstva, rozhdennogo ot alkohol'zavisimyykh matery. Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal. 2010;12(5):127-30. Russian.

4. Belenichev IF, Chekman IS, Gubskiy YuI. Doklini-

cheskoe izuchenie spetsificheskoy aktivnosti potentsial'nykh neyroprotektivnykh preparatov. Metodicheskie rekomendatsii Gosudarstvennogo Farmakologicheskogo Tsentra MZ Ukrainy. Kiev; 2010. Russian.

5. Belenichev IF, Bukhtiyarova NV, Volkov VP. Farmakologiya: kollektivnaya nauchnaya monografiya. Novosibirsk: Izd. «SibAK»; 2013. Russian.

6. Belenichev IF, Chekman IS, Bukhtiyarova NV, Gorbacheva SV. Tiol-disul'fidnoe ravновесие – opredelyayushchiy opredelyayushchiy faktor rezistentnosti neyronov k nitroziruyushchemu stressu v usloviyakh ishemii mozga. Zhurnal NAMN Ukraïni. 2013;19(1):3-11. Russian.

7. Gershteyn LM, Korneva IM, Rakhmanova VI. Morfokhimicheskie osbennosti neyronov gippokampa u krysa, razlichayushchikhsya po povedeniyu. Byul. eksperim. biologii i meditsiny. 2007;144(12):696-8.

8. Egorov AN, Belenichev IF, Sokolik EP. Sostoyanie glutationovoy sistemy golovnoy mozga prenatal'noy alkogolizirovannykh krysa na fone kursovogo naznacheniya tserebrokurina i tiotsetama. Farmakologiya i vrachebnaya toksikologiya. 2012;2(27):36-9.

9. Mazur IA, Voloshin NA, Belenichev IF. Tiotriazolin, ti-odaron v lechenii serdechno-sosudistykh patologiy. Zaporozh'e: Pechatnyy Mir; 2012. Russian.

10. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K. Al-Moundhri M. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2011;9(4):226-31.

11. Bassik MC. Exercise-induced Bcl-2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature.* 2012;18;481(7382):511-35.

12. Belenichev IF, Sokolik EP. Nitrozone stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides. *Inventi Rapid Molekular Pharmacology.* 2011;4:11-8.

13. Belenichev IF, Sokolik EP, Abramov AV. Pharmacological modulation of apoptosis signaling in neurons of CA1-zone of hippocampus of rats with chronic alcohol intoxication. *Innovative Journal of Medical and Health Science.* 2011;1(1):12-6.

14. Belenichev IF, Egorov A, Sokolik A. The impact of neurotrophic cerebroprotection on the expression of hsp70 in the brain of rats with prenatal chronic alcoholism. Conference: XXVIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & XIth International Conference on Quantification of Brain Function with PET Shanghai, China, May 20. 23. 2013. R.591

15. Ben-Neriah S. Concurrent expression of MYC and bcl-2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol.* 2012;1(28):34-52.

16. Boghaert ER. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013;19(2):220-8.

17. Chertin B, Rolle U, Farkas H. The role of nitric oxide in reflux nephropathy. *Pediatr Surg Int.* 2009;18:630-4.

18. Chen RM, Tai YT, Chen TG, Lin TH, Chang HC, Chen TL, Wu GJ, Chen RM. Propofol protects against nitrosative stress-induced apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells via an intrinsic mitochondrial mechanism. *Surgery.* 2013;6(154):58-68.

19. Neelam A. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;8(1203):1-6.