

І. Ф. Бєленічев, О. П. Соколик

Нітрозуючий стрес і неврологічні порушення при експериментальній алкогольній інтоксикації та їх фармакологічна корекція нейропептидами

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: нейрони, алкоголізація, нітрозуючий стрес, нейропротекція, цереброкурин

Розвиток оксидативного та нітрозуючого стресу відбувається при різноманітних захворюваннях головного мозку – при гострих порушеннях мозкового кровотоку у вигляді ішемічного та геморагічного інсультів, при черепно-мозкових травмах, при дисциркуляторних енцефалопатіях, токсичних енцефалопатіях різноманітного генезу [1, 2].

Відомо, що запуск процесу, що призводить до загибелі нейронів, може здійснюватися цитокінами, гормонами, активними формами кисню (АФК), дериватами оксиду азоту (NO), окисленими тіолами, продуктами окисної модифікації білків та нуклеїнових кислот [3–5].

Мозок є високочутливим до нітрозуючого стресу, особливе місце в ушкодженні білків та нуклеїнових кислот займає NO та його цитотоксичні деривати, які шляхом активації полі-(АДР-рибозо)-полімерази (ПАРП) здатні активізувати апоптоз [6–8]. Важлива роль в окисній деструкції білків належить NO-радикала, пероксинітриду, які атакують білкові молекули, утворюючи о-тирозин, 6-нітротриптофан, 3-нітротирозин, 3-хлортирозин, 2-оксогістидин, а також різноманітні карбонільні похідні [9–12].

N-, S-нітразування білкових фрагментів мембран нейроцитів погіршує чутливість та специфічність рецепторів, генерацію, утворення та провідність нервового імпульсу, порушує синаптичну передачу. Ці зміни призводять до порушення секреторної, інкреторної, транспортної функції нейронів, а також до зниження когнітивно-мнестичних функцій організму [13–17].

Раніше нами отримані дані про підвищення NO-синтазної активності в головному мозку щурів з експериментальним алкоголізмом. Але дотепер в існуючій літературі мало даних відносно патогенетичної ролі нітрозуючого стресу в механізмі алкогольного пошкодження мозку, що обумовлює актуальність обраної теми дослідження, а результати досліджень фрагментарні та неоднозначні [17–20].

Також нами отримані результати досліджень нейропротекторних властивостей препаратів пептидної структури (цереброкуруину, кортексину і церебролізіну) щодо впливу на метаболічні процеси в нервовій клітині та взаємодії з нейромедіаторними системами мозку. Тому, вважаємо за необхідне вивчити вплив цих препаратів на показники нітрозуючого стресу та параметри неврологічного дефіциту у тварин з експериментальною алкогольною інтоксикацією.

Мета роботи – вивчення впливу цереброкуруину, кортексину та церебролізіну на показники нітрозуючого стресу в головному мозку щурів і прояви неврологічного дефіциту, і виявити можливий кореляційний зв'язок.

Матеріали та методи. У досліджах використовували 50 білих безпорідних щурів-самців із масою тіла 180–220 г, яких утримували у віварії при вільному доступу до їжі (стандартний гранульований корм) і води, при природній зміні дня і ночі, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Всі експериментальні процедури здійснювали згідно до «Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях» [21, 22].

Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали щоденним внутрішньошлунковим введенням протягом перших

10 днів – 15 % розчину етанолу в дозі 4 г/кг, наступні 10 днів – 15 % розчину етанолу в дозі 6 г/кг і останні 10 днів щурам вводили 25 % розчин етанолу в дозі 3 г/кг (Мирзоян Р. С., 2001 р). З 30 доби припиняли акоголізацію і проводили експериментальну терапію досліджуваними препаратами та продовжували спостереження протягом 14 діб.

Усіх щурів було розділено на 5 груп:

- 1 група отримувала протягом 30 днів етанол та з 31 по 44 добу цереброкурин у дозі 0,06 мг/кг [23];
- 2 група отримувала протягом 30 днів етанол та з 31 по 44 добу церебралізін у дозі 4 мг/кг [23];
- 3 група отримувала протягом 30 днів етанол та з 31 по 44 добу кортексин у дозі 0,5 мг/кг [23];
- 4 група отримувала протягом 30 днів етанол (контроль);
- 5 група – інтактна (замість етанолу – фізіологічний розчин).

Щоденно оцінювали неврологічний статус щурів згідно з шкалою stroke index по McGrow (до 3 балів – легка ступінь, від 3 до 7 балів – середня ступінь та з 7 балів і вище – тяжка ступінь).

Кількісне визначення нітросилових протеїнів проводили за допомогою ELISA-набору NITROTYROSINE (набір № НК501, серія 4513K19).

Концентрація нітротирозину в зразках, вимірювання якої проводиться паралельно зі стандартами, може бути визначена по стандартній кривій.

Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм «Біостатистика для Windows, версія 4.03» і «Microsoft Excel 2002». Для кожної досліджуваної ознаки розраховували показники середнього арифметичного (M) і стандартної помилки репрезентивності середнього (m). Нормальність розподілу перевіряли з використанням тесту Колмогорова-Смирнова. За умови відповідності нормальності розподілу достовірність отриманих відмінностей величин, що порівнюються, оцінювали з використанням t-критерія Ст'юдента (або непараметричний аналог Mann-Whitney). Достовірність відмінностей відносних вели-

чин оцінювалася за допомогою критерію χ^2 . Взаємозв'язок між кількісними показниками оцінювали, використовуючи критерій Spearman (R) та шляхом проведення регресійного аналізу. Для всіх видів аналізу рівень достовірності розбіжностей між порівнювальними показниками вважали $\leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. На фоні хронічної алкогольної інтоксикації в щурів ми отримали підвищення показників нітросилових протеїнів у плазмі крові та в головному мозку, що відображає активацію процесів нітруючого стресу.

Рівень нітротирозину в плазмі крові щурів (табл. 1) в групі церебралізину на 39,98 % нижче рівня нітротирозину по відношенню до групи контролю.

Рівень нітротирозину в головному мозку щурів (табл. 2) в групі церебралізину на 23,37 % нижчий по відношенню до групи контролю.

Рівень нітротирозину в плазмі крові в групі кортексина достовірно нижче рівня нітротирозину по відношенню до групи контролю на 54,28 %, а в головному мозку на 39,20 %.

Ми щоденно оцінювали неврологічний стан щурів від початку експери-

Таблиця 1

Показники нітротирозину в плазмі крові щурів

Групи тварин (n=10)	Нітротирозин плазми крові, нмоль/г білка
Інтакт	6,91±1,52
Контроль	21,61±3,33
Церебралізін	12,97±2,28*
Кортексин	9,88±1,77*
Цереброкурин	7,03±1,81*

Примітка. Тут та в табл. 2–3: * $P \leq 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2

Показники нітротирозину в головному мозку щурів

Групи тварин (n=10)	Нітротирозин головного мозку, нмоль/г білка
Інтакт	17,23±3,05
Контроль	144,27±28,56
Церебралізін	110,55±19,90*
Кортексин	87,71±23,46*
Цереброкурин	25,26±2,63*

Оцінка неврологічного дефіциту тварин з експериментальним хронічним алкоголізмом з 1 по 44 день експерименту згідно з шкалою С.Р. McGrow, подовово в балах (1–30 доба – алкоголізація, 31–44 доба – лікувальний етап)

Група тварин (n=10)	1 доба	14 доба	31 доба	36 доба	44 доба
Інтакт	0	0,1±0,1*	0	0	0,1±0,1*
Контроль	0	3,40±0,47*	5,75±0,50*	5,35±0,72*	2,05±0,41*
Церебrolізін	0	4,25±0,49*	4,15±0,60*	1,85±0,37*	0,35±0,12*
Кортексин	0	4,40±0,53*	4,60±0,42*	1,65±0,28*	0,30±0,15*
Цереброкурин	0	4,6±0,3*	4,1±0,3*	0,30±0,15*	0,15±0,10*

менту і до закінчення та відмітили, що алкогольна інтоксикація призводила до стійких неврологічних порушень (тремор, хитка хода, порушення рухової активності), які зберігалися і після відміни прийому етанолу. Введення церебrolізіну та кортексину призводило до регресу неврологічної симптоматики протягом 7 днів від 6–7 до 1–2 балів по McGrow, з 7 по 14 день щури мали 1–2 бали по McGrow (табл. 3).

У групі цереброкуруину рівень нітритозину в плазмі крові знизився на 67,47 % достовірно по відношенню до контролю, а в головному мозку щурів достовірно нижче рівня нітритозину порівняно з групою контролю на 82,49 %.

Цереброкурин виявився найбільш ефективним препаратом, зменшуючи прояви неврологічної симптоматики вже з перших 3 днів лікування від 6–7 до 1–2 балів по McGrow. На фоні прийому цереброкуруину у тварин значно зменшилися прояви неврологічних порушень: тремор, ригідність хвоста, хаотичні рухи в клітці, птоз, гіперактивність, судомні скорочення м'язів з перших днів прийому на відміну від інших препаратів. Також цереброкурин виявив значний седативний вплив на тварин порівняно з іншими групами (зниження проявів гіперактивності, агресивності).

Механізм дії та точки впливу цереброкуруину принципово відрізняються від інших препаратів нейропептидної природи, зокрема, від церебrolізіну. Цереброкурин містить пептиди, які несуть у собі програму аналізу стану та будівництва ЦНС. Таким чином, кінцевий результат відрізняється через якісну різницю механізму дії. Захисні ефекти цереброкуруину на тканину

мозку включають його оптимізуючу дію на енергетичний метаболізм мозку та гомеостаз кальцію, стимуляцію внутрішньоклітинного синтезу білка, пригнічення процесів глутамат-кальцієвого каскаду, і перекисного окислення ліпідів. Разом із тим препарат має значні нейротрофічні ефекти.

Також встановлена здатність цереброкуруину підвищувати експресію гена транспортера глюкози через гематоенцефалічний бар'єр і таким чином підвищувати її транспорт до головного мозку. Нейротрофічні властивості цереброкуруину пов'язані із захистом цитоскелета нейронів в результаті інгібування кальційзалежних протеаз, у тому числі і кальпаїна, і збільшення експресії мікротубулярного кислого протеїну-2. Разом із цим цереброкурин підвищує афінність зв'язування BDNF із його рецепторами. Вплив препарату на trk-B-рецептори нейтрофінів свідчить про його дію на регуляцію факторів росту. Також цереброкурин попереджає гіперактивацію мікроглії та зменшує продукцію ІЛ-1 α та інших прозапальних цитокінів, що відображає вплив препарату на прояви місцевої запальної реакції і процеси оксидативного та нітрозуючого стресу.

Завдяки вищезазначеному цереброкуруин знайшов широке застосування в клінічній практиці [24, 25].

Нами було проведено також визначення взаємозв'язку між рівнем нітритозину в головному мозку щурів та проявами неврологічного дефіциту в балах по McGrow в групі контролю на час закінчення експерименту.

Як видно з результатів регресійного аналізу та при оцінці діаграми розсіювання взаємозв'язок між інтегральним

маркером нітрозуючого стресу (нітротирозин) та параметром, що характеризує вираженість неврологічного дефіциту (бальний показник по шкалі С. Р. McGrow), апроксимується моделлю лінійної регресії (рисунок).

Рівняння: бальний показник по шкалі С. Р. McGrow = $1,43 + 0,31 \cdot$ нітротирозин.

Це дозволяє в майбутньому програмувати на основі отриманих даних концентрації нітротирозину та її взаємозв'язок зі ступенем неврологічного дефіциту згідно шкали С. Р. McGrow.

$$Nt = -1,4121 + 24,3279 \cdot \log_{10}(x)$$

Множин. R = 0,92, F = 47,56, R² = 0,86. Отриманий взаємозв'язок є високо достовірним – P = 0,000125, β = 0,92, відношення Фішера F = 47,56, стандартна помилка обчислення 0,219.

Згідно з даними регресійного аналізу ми робимо висновок, що при рівні значень нітротирозину до 10 нмоль/г білка

значення неврологічного дефіциту згідно з шкалою С. Р. McGrow не перевищують 3 бали (тому що значення бальних показників згідно з шкалою С. Р. McGrow зосереджені в нижній частині діаграми, в початковій частині регресійної прямої).

Підвищення рівня нітротирозину відображає інтенсифікацію процесів окисної модифікації сигнальної молекули NO, також спостерігається прогресування погіршення неврологічного дефіциту.

При рівні значень нітротирозину більше 10 нмоль/г білка в 100 % випадків значення неврологічного дефіциту згідно з шкалою С. Р. McGrow перевищують 3 бали, що говорить про більш значущі зміни в неврологічному статусі.

Отримана помилка апроксимації (стандартна помилка апроксимації 0,219) говорить про адекватність побудованого графіка взаємозв'язку та про можливість якісного прогнозу бальних показ-

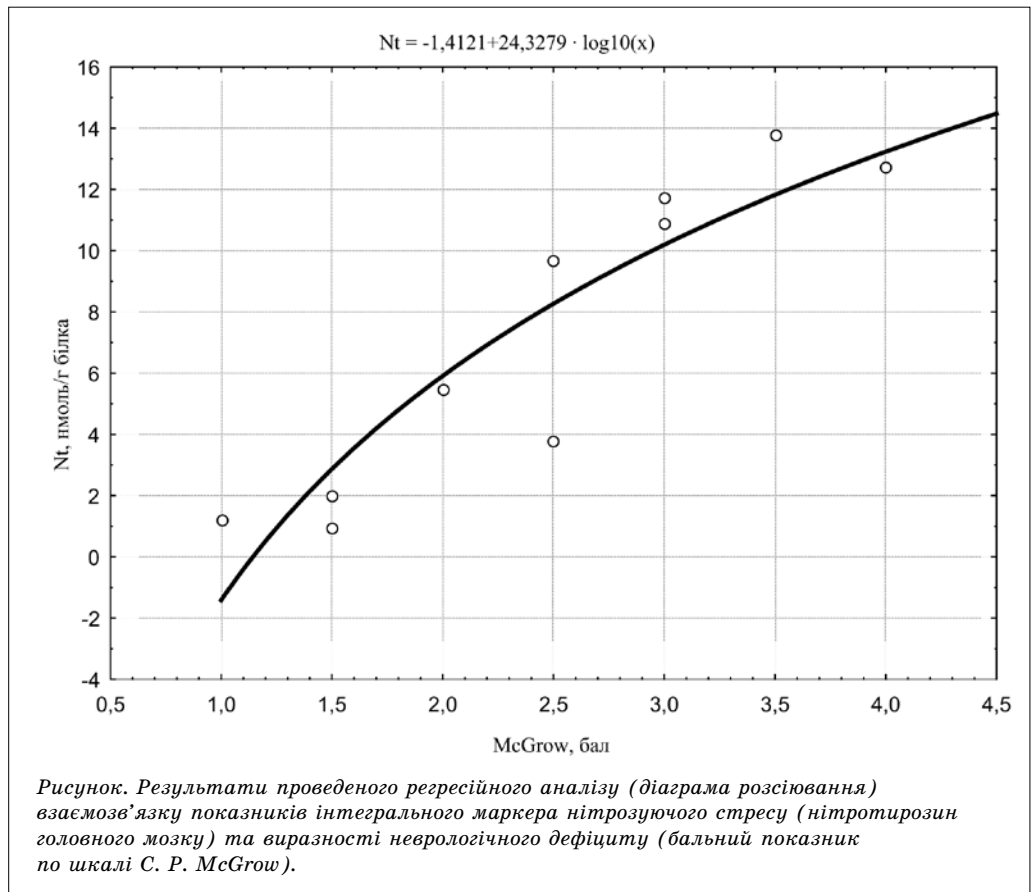


Рисунок. Результати проведеного регресійного аналізу (діаграма розсіювання) взаємозв'язку показників інтегрального маркера нітрозуючого стресу (нітротирозин головного мозку) та виразності неврологічного дефіциту (бальний показник по шкалі С. Р. McGrow).

ників згідно з шкалою С. Р. McGrow та нітротирозину.

Отримані результати свідчать про статистично значущий вплив нітротирозину на неврологічний дефіцит та про необхідність корекції окисно-відновного дисбалансу з NO-модуючим ефектом у рамках раціональної нейропротекції при хронічній алкогольній інтоксикації.

Наведені вище дані свідчать про те, що в механізмі нейропротективної дії досліджуваних препаратів (цереброкуруну, кортексину та церебралізіну) важливим є їх антиоксидантні властивості, що попереджує розвиток нітрозуючого стресу. Слід особливо відзначити препарат цереброкурун, що продемонстрував найбільшу ефективність серед вищезначених препаратів. Другим по ефективності виявився препарат кортексин, який знизив рівень нітротирозину в головному мозку на 39,20 % у порівнянні з контролем, а церебралізін лише на 23,37 % менше в порівнянні з контролем, виявившись найменш ефективним антиоксидантом.

Висновки

1. При моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації у щурів розвивався нітрозуючий стрес, про що свідчить підвищення значень нітро-

тирозину в цілому в організмі, та в головному мозку особливо. Нами був доведений статистично достовірний взаємозв'язок між рівнем нітротирозину в головному мозку щурів та бальним показником неврологічного дефіциту згідно з шкалою С. Р. McGrow.

2. Наведені вище дані свідчать про те, що в механізмі нейропротективної дії досліджуваних препаратів (цереброкуруну, кортексину та церебралізіну) важливим механізмом є антиоксидантний, що попереджує розвиток нітрозуючого стресу, і як результат цього – захист нейронів від ушкоджуючої дії цитотоксичних продуктів нітрузування та нормалізація неврологічного статусу.
3. Найбільш активним препаратом серед вищезначених виявився цереброкурун, який продемонстрував суттєве зниження рівня нітротирозину в плазмі крові щурів на 67,47 % достовірно по відношенню до контролю, та особливо в головному мозку на 82,49 % по відношенню до контролю на фоні паралельної нормалізації показників неврологічного стану. Це є експериментальним обґрунтуванням до включення цереброкуруну у традиційну схему лікування хронічного алкоголізму.

1. *Беленічев І. Ф.* Мітохондріальна дисфункція при церебральній патології. Нейропротекція Цереброкуруном / Беленічев І. Ф., Колесник Ю. М., Павлов С. В. [та ін.] // Міжнародний неврологічний журнал. – 2008. – № 4 (20). – С. 23–29.
2. *Беленічев І. Ф.* Роль гена раннього реагування *c-fos* в нормі і при нейродеструктивній токсичній патології. Можливості фармакокорекції нейропептидними лікарськими засобами / Беленічев І. Ф., Левицький Є. Л., Павлов С. В. // Суч. пробл. токсикол. – 2008. – № 1. – С. 17–27.
3. *Беленічев І. Ф.* Раціональна нейропротекція / І. Ф. Беленічев, В. І. Черній, Ю. М. Колесник. – Донецьк: видавець Заславський А. Ю., 2009. – 262 с.
4. *Левицький Є. Л.* Свободнорадикальні пошкодження ядерного генетического апарата клетки / Левицький Є. Л., Губський Ю. І. // Укр. біохім. журн. – 1994. – Т. 66, № 4. – С. 18–30.
5. *Соколовський В. В.* / Вопр. мед хімії. – 1998. – Т. 6, № 34. – С. 2–11.
6. *Дубнина Е. Е., Морозова М. Г., Гавровская С. В.* [и др.] / Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 413–421.
7. Новые возможности лечения алкогольной болезни. Перспективы применения цереброкуруна / [Беленічев І. Ф., Павлов С. В., Соколик Е. П., Бухтиярова Н. В.] // Международный неврологический журнал. – 2008. – № 2 (20).
8. *Zaidi A., Miachaelis M. L.* / Free Rad. Biol. – 1999. – V. 27. – P. 810–821.
9. *Dean R.T., Hunt J.V., Grant A.J.* [et al.] / Free Rad. Biol. Med. – 1991. – V. 11, № 12. – P. 161–165.
10. *Арцукевич А. Н.* Биохимич. аспекты жизнедеятельности биологических систем / Арцукевич А. Н., Мальцев А. Н., Зинчук В. В. // Сбор. науч. трудов съезда биохимиков Беларуссии. Гродно. – 2000. – С. 19–23.
11. *Miyata T., Inagi R., Asashi K., Hhorie K.* [et al.] / FEBS Lett. – 1998. – V. 437, № 1–2. – P. 24.
12. *Salo P.S., Pacifici R.E., Lin S. W.* [et al.] / Biochem J. – 1990. – V. 265, № 20. – P. 11919–11927.
13. *Levine R. L., Garland D., Oliver C. N.* / Meth. Enzymol. – 1990. – V. 186. – P. 464–478.

-
14. Дубнина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. А. // Вопр. мед. химии.– 1995.– Т. 41, № 1.– С. 24–26.
 15. Соколовский В. В. Тиолдисульфидные соотношения крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В. В. Соколовский.– Спб., 1996.– 30 с.
 16. Packer L. Free Radicals in the Brain. Aging / Packer L., Prilipko L., Christen Y. // Neurological and Mental Disorders.– Berlin; New York: Springer-Verlag, 1992.– P. 21–41.
 17. Bongarzone E. R., Pasquini J. M., Soto E. F. / J. Neurosci Res.– 1995.– V. 41.– P. 213–221.
 18. Crune T., Michel P., Sitte N. [et al.] / Free Radic. Biol. Med.– 1997.– V. 23.– P. 357–360.
 19. Ciolino H. P. and Levine R. L. / Free Rad. Biol.– 1997.– V. 22.– P. 1277–1282.
 20. Pigeolit E., Corbiser P., Houbion A. [et al.] / Mech. Ageing and Develop. –1990.– V. 51.– P. 283–287.
 21. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації по утриманню лабораторних тварин і роботі з ними / Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдинова Г. А.– Київ, 2002 р.
 22. Хабрієв Р. У. Рекомендації по експериментальному (доклінічному) вивченню нових фармакологічних речовин / Р. У. Хабрієв.– Москва, 2005 р.
 23. Довідник Відаль «Лікарські препарати Росії», Москва, Росія, 2010 р.
 24. Єна Л. М. Матеріали експериментальних і клінічних випробувань препарату «Цереброкурин®» / [Єна Л. М., Кузнецова С. М., Кузнецов В. Н. та ін.]– Київ, 1997.– 115 с.
 25. Сергієнко А. Н. Застосування препарату «Цереброкурин®» при лікуванні дегенеративно-дистрофічних захворювань сітківки / Сергієнко А. Н. // Новини медицини та фармації.– 2001.– № 12 (97).– С. 8.

И. Ф. Беленичев, О. П. Соколик

Нитрозирующий стресс и неврологические нарушения при экспериментальной алкогольной интоксикации и их фармакологическая коррекция нейропептидами

В статье освещена проблема алкоголизма и новые методы коррекции процессов нитрозирующего стресса, возникающего в результате этого.

Нами был проведен эксперимент – 30-дневная алкоголизация четырех групп крыс 15 % этиловым спиртом с последующим двухнедельным курсом лечения цереброкурином, церебролизином, кортексином. В результате терапии все препараты имели антиоксидантное действие в различной степени выраженности. Самый эффективный препарат цереброкурин показал достоверно эффективное снижение показателей нитрозирующего стресса в плазме крови на 67,47 % по отношению к контролю, и особенно в гомогенате мозга крыс – на 82,49 % достоверно по отношению к контролю, и одновременно самую быструю нормализацию неврологического статуса.

Ключевые слова: нейроны, алкоголизация, нитрозирующий стресс, нейропротекция, цереброкурин

I. F. Belenichev, E. P. Sokolik

Nitrozin stress and neurological disorders in experimental alcohol intoxication and their pharmacological correction by neuropeptides

In the article was shown the problem of alcoholism and new methods of correction of processes nitrosine stress, resulting from it.

As a result of therapy all preparations had antioxidant action in a various degree of expressiveness.

On rats in 4 groups we fulfilled an experiment-30-day's alcoholisation with 15 % ethyl alcohol with the subsequent 2 weeks course of treatment of the rats by cerebrocurin, cerebrolisin and kortexin.

The most effective preparation cerebrocurin has shown reliably effective decrease in parameters nitrosine stress in plasma of blood by 67.47 % in relation to the control, and especially in brain of the rats – by 82.49 % reliably in relation to the control and at the same time the most fast normalization of the neurologic status.

Keywords: neurons, alcoholism, nitrosin stress, neuroprotection, cerebrocurin

Надійшла: 19.03.2010 р.

Контактна особа: Соколик Олена Петрівна, аспірант, кафедра фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет. Тел.: 097 059-4381. E-mail: sokoliker@gmail.com