

Українська академія наук  
Вищий державний навчальний заклад України  
Українська медична стоматологічна академія



**ВІСНИК**  
**ПРОБЛЕМ БІОЛОГІЇ**  
**І МЕДИЦИНИ**

Випуск 1, Том 1 (126)

© <sup>1,2</sup>Беленичев И. Ф., <sup>1</sup>Павлюк И. В., <sup>1</sup>Абрамов А. В., <sup>1,2</sup>Кучеренко Л. И.

УДК 616.89-48-02-091.8

<sup>1,2</sup>Беленичев И. Ф., <sup>1</sup>Павлюк И. В., <sup>1</sup>Абрамов А. В., <sup>1,2</sup>Кучеренко Л. И.

**ВЛИЯНИЕ АНГИОЛИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СА-1 ЗОНЫ ГИППОКАМПА И ПРОЦЕССЫ НЕЙРОАПОПТОЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕБНОМ РЕЖИМЕ ВВЕДЕНИЯ**

<sup>1</sup>Запорожский государственный медицинский университет (г. Запорожье)

<sup>2</sup>НПО «Фарматрон» (г. Запорожье)

podium@bigmir.net

Исследования выполнены в рамках темы научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии Запорожского государственного медицинского университета: «Целенаправленный поиск биологически активных веществ в ряду азагетероциклов и создание оригинальных лекарственных средств и фиксированных комбинаций лекарственных препаратов», № регистрации – 0113 У 000802 и темы кафедры фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ: «Молекулярно-биохимические механизмы формирования митохондриальной дисфункции нейронов головного мозга в условиях острой церебральной ишемии: новые мишени нейропротекции», № регистрации 011400797.

**Вступление.** Ежегодно в Украине от алкоголизма умирает свыше 40 тысяч лиц и насчитывается более чем 900 тысяч хронических алкоголиков, а также еще больше людей, которые достаточно часто употребляют алкогольные напитки [8,9,13]. Интоксикация алкоголем, длящаяся годами, вызывает стойкие морфологические изменения в различных органах [1,3,10,11]. Большим с хронической интоксикацией алкоголем свойственны диффузные изменения, распространенные по всей нервной системе, и очаговые поражения (местный паренхиматозный распад, глиозные рубцы, кровоизлияния, преимущественно расположенные в определенных местах, главным образом под эпендимой на дне III желудочка, в силвиевом водопроводе); отмечаются также изменения в периферических нервах [3,4,10,11].

Поиск новых методов фармакокоррекции морфо-функциональных изменений нейро-глиальных структур головного мозга и восстановление межнейронных взаимодействий является актуальным и необходимым вопросом современной нейрофармакологии. К сожалению, базовые ноотропы и нейрометаболические препараты (пирацетам, милдронат, цитофлафин, соли янтарной кислоты) не всегда оказывают ожидаемый нейропротективный эффект [3,4,12]. Обнадёживающие результаты показали нейротрофические церебропротекторы (цереброкурин, кортексин, церебролизин) и нейрометаболический церебропротектор тиоцетам (в состав кото-

рого входят пирацетам с тиотриазолином), которые продемонстрировали хорошие результаты при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс [1,2,3,11]. Сотрудниками НПО «Фарматрон» под руководством профессора И. А. Мазура путем химической модификации молекулы 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацета (тиотриазолина) разработан новый оригинальный нейро- и кардиопротектор Ангиолини ((S)-2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат). Ангиолин обладает выраженным влиянием на эндотелий сосудов мозга и миокарда, нейропротективными, кардиопротективными, метаболитотропными, антиоксидантными, энерготропными свойствами [6,7].

Исходя из выше изложенного, **целью** настоящей **работы** явилось изучение нейропротективного действия Ангиолина при хронической алкогольной интоксикации по влиянию на морфо-функциональные показатели нейронов СА<sub>1</sub> зоны гиппокампа.

**Объект и методы исследования.** Исследования проводились на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 160-180 г, полученных из вивария Института фармакологии и токсикологии АМН Украины. Все манипуляции были проведены согласно положению об использовании животных в биомедицинских опытах (Страсбург, 1986 г., с изменениями, внесенными в 1998 г.). Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали ежедневным внутривидеочным 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, проводили экспериментальную терапию изучаемыми препаратами и продолжали наблюдение в течение 14 дней. Исследуемые препараты вводили 1 раз в сутки в течение 14 суток после 30-суточной алкоголизации внутривидеочно в виде суспензии, стабилизированной Твином-80 с помощью металлического зонда: Ангиолин в дозе 100 мг/кг, Милдронат – 250 мг/кг [3]. В этой серии эксперимента было четыре группы животных:

- 1) интактные, получали физиологический раствор с Твином-80 (10 крыс);
- 2) контрольные – нелеченные с хронической алкогольной интоксикацией (ХАИ), получали физиологический раствор с Твином-80 (20 крыс);
- 3) животные с ХАИ, получавшие «Ангиолин» (20 крыс);
- 4) животные с ХАИ, получавшие Милдронат (20 крыс).

В работе использовались: таблетки Ангиолин 200 мг производства ПАО «Киевмедпрепарат» и Милдронат в капсулах по 250 мг производства АО «Гриндекс» (Латвия). По окончании эксперимента животные наркотизировались тиопентал натрием (40 мг/кг) и у них извлекался головной мозг, который помещали на сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парафин. Для изучения морфологии нейронов на ротационном микротоме изготавливали срезы СА-1 зоны гиппокампа толщиной 5 микрон. Срезы гиппокампа депарафинировали и окрашивали для определения нуклеиновых кислот галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарссону [5]. Морфометрические исследования проводили на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия), увеличение x40. Изображения нейронов в области зоны СА-1 гиппокампа, получаемые на микроскопе, с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в компьютерную программно-аппаратную систему цифрового анализа изображения VIDAS. Анализ изображений проводили в полуавтоматическом режиме. Сравнение групп проводили при помощи критерия U-Уитни-Манна. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (Stat Soft Inc., № AXX R712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

**Результаты исследования и их обсуждение.**

Хроническая интоксикация алкоголем в течении 30 суток приводит к стойким морфологическим изменениям в СА1-зоне гиппокампа головного мозга экспериментальных животных. Токсическое влияние этилового спирта на нейроны СА-1 зоны гиппокампа ярко проявилось в контрольной группе, которая получала только этанол. Так, плотность нейронов в этой группе снизилась на 44,2% за время насильственной алкоголизации по сравнению с группой интактных животных, на фоне уменьшения плотности нейронов на 31% и концентрации РНК в нейронах на 40,7% (табл. 1).

После 14-дневной терапии Милдронатом плотность нейронов составила на 18% больше по отношению к контролю, а после терапии Ангиолином – на 49,3% больше по сравнению с контролем. На рисунке представлены фотографии нейронов СА-1 зоны гиппокампа крыс с хронической алкогольной интоксикацией и последующим 14-дневным лечением.

Проводимая экспериментальная терапия оказывала положительное влияние на плотность нейронов СА1-зоны гиппокампа экспериментальных

Таблица 1.

**Влияние Ангиолина и Милдроната на плотность нейронов, площади тел нейронов, содержание РНК в зоне СА-1 гиппокампа крыс с 30-дневной алкогольной интоксикацией и последующим 14-дневным лечением**

Исследуемые показатели	Плотность нейронов (нейрон/мм <sup>2</sup> )	Площадь нейронов (мкм <sup>2</sup> )	Содержание РНК (E <sub>opt</sub> )
Интакт (n = 10)	1442,5 ± 132,1	161,6 ± 14,2	15,18 ± 1,1
Контроль (хроническая алкоголизация) (n = 10)	804 ± 80,9	111,0 ± 7,2	9 ± 0,7
Милдронат, 250мг/кг (n = 10)	951,1 ± 77,2* (-18%)	120 ± 11,7 (+8%)	9,87 ± 0,87 (+9%)
Ангиолин, 100 мг/кг (n = 10)	1201,8 ± 105,5* <sup>†</sup> (-49,3%)	151,7 ± 15,1* <sup>†</sup> (+36%)	14,82 ± 1,7* <sup>†</sup> (+64%)

Примечание: \* – p ≤ 0,05 относительно контроля;

<sup>†</sup> – p ≤ 0,05 относительно милдроната.

животных. Так, Милдронат улучшил этот показатель только на 8% по сравнению с контролем, а Ангиолин – на 36% выше по отношению к контролю. Также повысилось содержание РНК в группе Милдроната на 9,6%, в группе Ангиолина – на 62% по отношению к контролю. Обнаруженные изменения, по нашему мнению, отражают характер повреждения нейронов в условиях хронической алкогольной интоксикации, выражавшийся в значительном уменьшении структурных и пластических компонентов клеток [12]. Курсовое назначение Ангиолина демонстрировало более выраженное нейропротективное действие, чем у Милдроната, которое характеризовалось восстановлением плотности и площади тел нейронов по сравнению с интактной группой животных, а также значительным восстановлением содержания РНК в клетках. Таким образом, по результатам морфогистохимического анализа нейронов СА-1 зоны гиппокампа Ангиолин демонстрировал положительные эффекты на репаративные процессы в нейронах, обеспечивая тем самым нейропротекцию в условиях хронической алкогольной интоксикации.

Изменение глиальных структур под влиянием алкоголя проявилось в уменьшении в группе нелеченных животных (контроль) плотности глиальных клеток на 32% на фоне уменьшения их площади на 28% и снижения концентрации РНК на 36,5% по сравнению с группой интакта (табл. 2). Милдронат повысил этот показатель на 3,3%, а Ангиолин – на 38,7% по отношению к контрольной группе.

Исследуемые препараты также увеличили площадь глиальных клеток: в группе Милдроната – на 6,5%, в группе Ангиолина – на 35,7% по отношению к группе контроля. Также повысилось содержание РНК в ядрах глиальных клеток: в группе Милдроната – на 3,36%, а в группе Ангиолина –

Таблиця 2.

**Влияние Ангиолина и Милдроната на плотность глии, площадь глии, содержание РНК в зоне СА-1 гиппокампа крыс с 30-дневной алкогольной интоксикацией и последующим 14-дневным лечением**

Исследуемые показатели	Плотность глиальных клеток (нейрон/мм <sup>2</sup> )	Площадь глиальных клеток (мкм <sup>2</sup> )	Содержание РНК (E <sub>оп</sub> )
Интакт (n = 10)	450,3 ± 51,7	25,1 ± 3,3	6,1 ± 0,55
Контроль (хроническая алкоголизация) (n = 10)	303,9 ± 41,2	18,2 ± 2,34	3,87 ± 0,43
Милдронат, 250мг/кг (n = 10)	314 ± 85,9 (+3,6%)	19,7 ± 2,4 (+8%)	4,00 ± 0,80 (+3%)
Ангиолин, 100 мг/кг (n = 10)	421,8 ± 31,3* <sup>1</sup> (+38,7%)	24,7 ± 3,1* <sup>1</sup> (+36%)	6,23 ± 0,87* <sup>1</sup> (+61%)

Примечание: \* - p ≤ 0,05 относительно контроля;  
<sup>1</sup> - p ≤ 0,05 относительно милдроната.

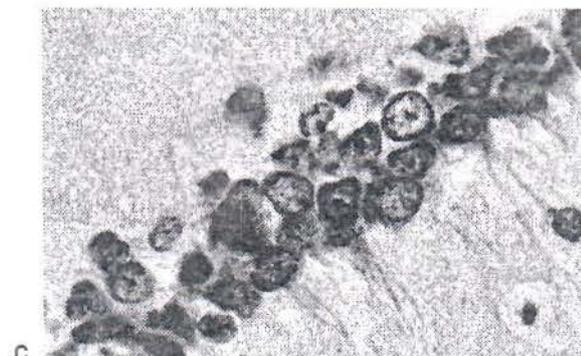
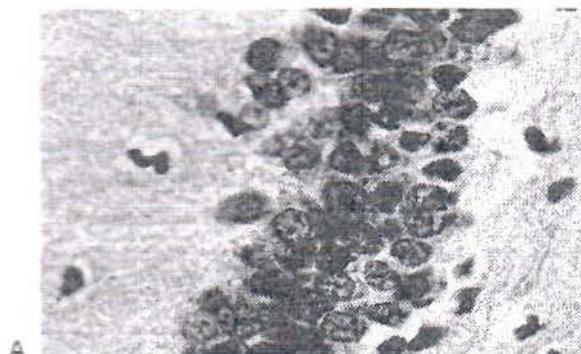


Рис. Картина нейродегенерации после 30-дневной алкогольной интоксикации и последующего 14-дневного лечения (применялась окраска галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону, увеличение х40).

A – СА-1 зона гиппокампа у животных группы интакта;  
 B – СА-1 зона гиппокампа у животных контрольной группы;  
 C – СА-1 зона гиппокампа у животных группы Ангиолина;  
 D – СА-1 зона гиппокампа у животных группы Милдроната.

на 61,0% по отношению к группе контроля. Накопление в нейрональной клетке продуктов окислительной модификации липидов, белков, нуклеиновых кислот в условиях хронической алкогольной интоксикации, как было отмечено нами в предыдущих работах, может приводить к токсической и апоптической гибели определенной популяции нервных клеток [2,3,11]. Анализ плотности деструктивно измененных и апоптических нейронов в СА-1 зоне гиппокампа показал, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождалась увеличением плотности поврежденных клеток на 132,0% по отношению к интакту (табл. 3).

Введение препарата Милдроната приводило к значительному снижению плотности деструктивно измененных нейроцитов (на 7,6%), не достигая при этом уровня интактной группы (78,3 ± 12,11 на 1 мм<sup>2</sup>). Терапия Ангиолином привела к значительному снижению количества апоптических и деструктивно измененных нейронов – на 38,2% меньше, чем у контрольной группы. Важно отметить, что наличие деструктивно измененных нейронов у интактной группы животных объясняется естественной гибелью клеток. В условиях хронической алкогольной интоксикации такие клетки в первую очередь подвергаются апоптозу [1,3,10]. Очевидно, что Ангиолин оказывал нейропротективное действие главным образом на функционально полноценные нейроны, упреждая в них деструктивные процессы.

После терапии Ангиолином и Милдронатом также снизилась доля апоптотических клеток: в группе Милдроната – на 14,1%, а в группе Ангиолина – на 55,4% по отношению к группе контроля, где этот показатель составил 19,8 ± 2,21, в то время как в группе интакта доля апоптотических клеток

Таблиця 3.

**Влияние Ангиолина и Милдроната на плотность апоптических и деструктивно измененных клеток в зоне СА-1 гиппокампа головного мозга крыс с 30-дневной алкогольной интоксикацией и последующим 14-дневным лечением**

Исследуемые показатели	Плотность апоптических клеток на 1 мм <sup>2</sup>	Доля апоптических клеток, %
Интакт (n = 10)	78,3 ± 8,11	4,2 ± 0,80
Контроль (хроническая алкоголизация) (n = 10)	181,6 ± 21,0	19,8 ± 2,21
Милдронат, 250 мг/кг (n = 10)	167,7 ± 15,1 (-7%)	17,0 ± 2,12 (-14%)
Ангиолин, 100 мг/кг (n = 10)	112,2 ± 12,33* <sup>1</sup> (-38%)	8,83 ± 0,92* <sup>1</sup> (-55%)

Примечание: \* – p ≤ 0,05 относительно контроля; – p ≤ 0,05 относительно милдроната.

составила 4,2 ± 0,80. Эти данные свидетельствуют о снижении антиапоптической защиты и активации процессов некроза и апоптоза. Нейропротективные свойства Ангиолина обусловлены превращением входящего в структуру молекулы L-лизина в пипеквалиевую кислоту, которая усиливает аффинность ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса, за счет чего снижаются проявления глутаматной эксайтотоксичности и может уменьшаться гибель нейронов [3]. Ангиолин проявляет

выраженные антиоксидантные свойства, активирует глутатионовое звено тиол-дисульфидной системы, повышает активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, снижает образование активных форм кислорода, снижает накопление маркеров оксидативного и нитрозирующего стрессов [3]. Таким образом, Ангиолин оказывает выраженное нейропротективное и антиапоптическое действие в условиях хронической алкогольной интоксикации, по силе превышающее аналогичное действие Милдроната.

**Выводы**

1. При формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс в течение 30 дней в группе контроля отмечено уменьшение плотности, площади и содержания РНК в нейронах и глиальных клетках СА-1 зоны гиппокампа головного мозга, а также увеличение плотности и доли апоптотически измененных клеток.

2. Проведенная после 30-дневной алкоголизации 14-суточная терапия Ангиолином (100 мг/кг, внутривенно) оказала достоверное положительное влияние на площадь и плотность как нейронов, так и глиальных клеток СА-1 зоны гиппокампа, а также на содержание в них РНК, и значительно уменьшила процессы апоптоза.

3. По силе нейропротективного и антиапоптического действия Ангиолин достоверно превосходит референс-препарат Милдронат (250 мг/кг, внутривенно) по всем изучаемым показателям.

4. Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием для включения Ангиолина в традиционную схему лечения алкоголизма.

**Перспективы дальнейших исследований**

В дальнейших исследованиях планируется продолжить изучение нейропротективного действия Ангиолина при хронической, а также острой, алкогольной интоксикации.

**Литература**

- Беленичев И. Ф. Снижение апоптической гибели нейронов СА1 зоны гиппокампа крыс в условиях пренатальной хронической алкоголизации и на фоне введения цереброкурина и тиоцетама / И. Ф. Беленичев, А. А. Егоров, О. В. Спахи // *Нейронауки: теоретические и клинические аспекты.* – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 145-151.
- Беленичев И. Ф. Нитрозирующий стресс в головном мозге пренатально алкоголизированных крыс: эффекты Тиоцетама / И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Н. В. Бухтиярова // *Патология.* – 2012. – № 3 (26). – С. 124.
- Беленичев И. Ф. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, С. В. Павлов [и др.]. – Киев: Логос, 2015. – 512 с.
- Бонитенко Е. Ю. Моделирование токсических ком, вызванных веществами депримирующего действия. Труды института токсикологии, посвященные 75-летию со дня основания / Под. ред. С. П. Нечипоренко, СПб. – 2010. – С. 16-30.
- Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, И. Ф. Беленичев, Ю. М. Колесник. – Методические рекомендации ГФЦ МЗ Украины, Киев. – 2010. – 81 с.
- Патент 2370492 РФ, МПК С 07 D 413/00 (2006.01). Лизиний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиопротективное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное противогипоксическое действие и обладающий низкой токсичностью / Мазур И. А., Беленичев И. Ф., Колесник Ю. М., Абрамов А. В., Кучеренко Л. И., Волошин Н. А., Чекман И. С., Мамчур В. И., Горчакова Н. А., Георгиевский Г. В., Грошовый Т. А. (UA); заявитель и патентообладатель ООО НПО «Фарматрон». – № 2007121014; заявл. 04.06.07; опубл. 20.10.09, Бюл. 29.
- Патент 86668 Україна, МПК С 07 D 249/08 (2009.01), А 61 К 31/4196, А 61 Р 9/00, А 61 Р 9/10 (2009.01), А 61 Р 25/28 (2009.01). Лізіній 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат / Мазур І. А., Беленічев І. Ф., Колеснік Ю. М., Абрамов А. В., Кучеренко Л. І., Волошин М. А., Чекман І. С., Мамчур В. Й., Горчакова Н. О., Георгієвський Г. В., Грошовий Т. А.; заявник і патентовласник ТОВНВО «Фарматрон». – № а200705865; заявл. 25.05.07; опубл. 12.05.09, Бюл. 9.
- Осыченко А. С. Особенности статистических данных отравлений алкоголем / А. С. Осыченко, А. Д. Донника // *Adv. curr. nat. sci.* – 2011. – № 8. – С. 128-130.
- Alcohol use and addiction services in Ukraine / A. V. Samokhvalov, V. S. Pidkorytov, I. V. Linsky [et al.] // *International Psychiatry.* – 2009. – Vol. 6, № 1. – P. 5-7.