

ВЛИЯНИЕ СРЕДСТВ С НООТРОПНЫМИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ НА ПРОЦЕССЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И ПРОЯВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Жилюк В. И., Мамчур В. И., Павлов С. В.¹, Бухтиярова Н. В.¹

Днепропетровская государственная медицинская академия;

¹Запорожский государственный медицинский университет

На сегодняшний день когнитивная дисфункция и деменция, развивающиеся при сахарном диабете, рассматриваются не только как результат нарушения мозгового кровообращения, оксидативного и нитрозирующего стресса, но и как следствие нейродегенеративных процессов в ЦНС. В частности, диабет может способствовать ускорению формирования, а также ухудшению течения болезни Альцгеймера [1–3]. При этом в основе развития нейродегенерации как диабетического, так и альцгеймеровского типа может лежать митохондриальная дисфункция (МД) [4–6]. Значение МД в механизмах старения, нейродеструкции и нейродегенерации подтверждено множеством исследований. Митохондрии не только обеспечивают клетку энергией, но являются источником продукции активных форм кислорода (АФК) и играют центральную роль в реализации процессов программированной клеточной гибели. При слабой

антиоксидантной защите свободные радикалы могут повреждать митохондриальные структуры: мембраны, белки, мтДНК и при этом формировать «порочный круг», способствуя тем самым увеличению продукции АФК [7, 8]. В данных условиях активация процессов нейроапоптоза может являться первопричиной развития стойких нарушений когнитивно-мнестических функций ЦНС [9].

Согласно представленным данным, проведение фармакотерапии должно учитывать механизмы развития повреждения нервной ткани и, в частности, прогрессирование митохондриальной дисфункции у больных диабетической патологией.

Целью нашего исследования было изучение энергетического обмена в тканях головного мозга аллоксан-диабетных крыс, а также определение влияния пираретама, прамирацетама и экстракта гинкго билоба на проявления митохондриальной дисфункции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на 50 белых крысах линии Вистар массой 250 — 300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария (температура воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$, светлый/темный цикл — 12/12 часов).

Экспериментальный диабет моделировали с помощью однократного подкожного введения водного раствора аллоксана мо-

ногидрата (Sigma, США) в дозе 150 мг/кг в виде 5% раствора в ацетатном буфере, рН 4,5 [10–12]. Введение аллоксана осуществляли после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде.

С целью формирования полного и стабильного диабета животных содержали

на протяженні 11 суток на стандартній дієті.

Уровень глюкозы крови определялся на 11 сутки после введения аллоксана с помощью глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для последующих исследований использованы только животные с повышенным уровнем глюкозы (> 11 ммоль/л) [10, 11].

На 30 сутки животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации с последующей декапитацией. Головной мозг извлекали на льду, впоследствии выделяли фрагмент мозга, который промывался 0,15 М КСl (4°C) и гомогенизировался в 10-кратном объеме раствора для гомогенизации (250 мМ сахароза, 20 мМ трисаминометан, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4).

Состояние энергетического обмена в мозге крыс оценивали по содержанию лактата, пирувата, изоцитрата, малата и аспартата [13]. Адениновые нуклеотиды определяли методом тонкослойной хроматографии [14].

Митохондриальную дисфункцию оценивали по открытию митохондриальной поры (МП) и митохондриальному трансмембранному потенциалу (ψ) [9, 15, 16]. Для выделения митохондрий гомогенат центрифугировался 7 мин. при 700 g. В дальнейшем осадок удалялся, а супернатант центрифугировался 15 мин. при 11 000 g (4°C). Полученный осадок суспендировался в небольшом объеме среды без ЭДТА и хранился при $0 - +1^{\circ}\text{C}$. В дальнейшем суспензию митохондрий (1 мг белка в пробе) вносили в инкубационную среду (70 мМ сахарозы, 5 мМ НЕРЕС, 70 мМ КСl, 0,5 — 1 мМ KH_2PO_4 , рН 7,4). Открытие митохондриальной поры инициировали внесением циклоспорина-А (0,5 мл) и определяли спектрофотометрически при $\lambda = 540$ нм при 25°C при постоянном перемешивании в течение 25 мин.

Митохондриальный трансмембранный

потенциал ($\Delta\psi_m$) изучали путем внесения в среду 9 мкМ сафронина О. Спектрофотометрию осуществляли при длине волны 515 и 525 нм. $\Delta\psi_m$ определяли по разности светопоглощения при 515 и 525 нм ($\Delta A_{515-525 \text{ нм}}$). Данный потенциал создается электрохимическим градиентом протонов по обе стороны мембраны, и его поддержание обеспечивается процессами переноса электронов в дыхательной цепи. $\Delta\psi_m$ может служить характеристикой и митохондриальной функции, и состояния клетки в целом [16].

В ходе исследований животные были распределены на пять групп:

I — интактные, $n = 10$;

II — животные с экспериментальным сахарным диабетом (контроль), $n = 10$;

III — АД + пирацетам в дозе 500 мг/кг, $n = 10$;

IV — АД + прамирацетам в дозе 300 мг/кг, $n = 10$;

V — АД + экстракт гинко билоба (EGb 761) в дозе 40 мг/кг, $n = 10$.

Исследуемые вещества вводили внутривенно один раз в сутки на протяжении 20 дней, начиная с 11 дня после введения аллоксана и установления уровня гипергликемии. Животным I и II групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутривенно вводили дистиллированную воду.

Все исследования проведены согласно Конвенции Совета Европы от 18.03.1986 г. об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях.

Полученный цифровой материал обрабатывали стандартными методами с помощью программы статистического анализа StatPlus, AnalystSoft, версия 2006. Достоверность отличий средних арифметических (\bar{x}) определялась с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных нами экспериментальных исследований указывают на то, что течение аллоксанового диабета сопро-

вождалось нарушениями процессов окислительного фосфорилирования. Свидетельством этого служил выраженный дефицит

АТФ, проявляющийся снижением содержания этого вещества в тканях головного мозга на 67,5 % ($p < 0,001$), по сравнению с показателями, зафиксированными в группе интактных животных, при существенном повышении концентрации его предшественника — АМФ (на 72 %, $p < 0,001$) (см. табл.). У крыс с хронической гипергликемией также наблюдалось значительное увеличение содержания лактата на фоне снижения содержания пирувата, что свидетельствовало об усилении гликолитического механизма образования энергии. Существенные изменения имели место и в функционировании аэробного пути метаболизма глюкозы, о чем свидетельствовало сниженное, по сравнению с интактной группой, содержание исследованных нами субстратов цикла Кребса — малата, изоцитрата и аспартата (см. табл.).

Использование ноотропов способствовало нормализации энергетического обмена, нарушенного вследствие диабетической патологии. Так курсовое внутривенное введение пирацетама в течение 20 дней крысам с гипергликемией приводило к увеличению в 1,4 раза ($p < 0,001$) продукции АТФ. Данный процесс, вероятно, связан с увеличением синтеза этого макроэргического соединения в реакциях гликолиза.

Применение экстракта гинко билоба приводило к сопоставимому с группой пирацетама увеличению синтеза АТФ. При использовании данного средства отмечалась и активация аэробного пути окисления, о чём свидетельствовало достоверное повышение (на 33,3 %, $p < 0,01$) уровня малата при неизменном содержании лактата (табл.).

Наиболее выраженное (на 74 %, $p < 0,001$) увеличение продукции АТФ в ткани головного мозга отмечено у животных, которым внутривенно на протяжении 20 дней водили прамирацетам. Параллельно в этой группе отмечено достоверное (на 31,2 %, $p < 0,001$) снижение уровня АМФ. Следует отметить, что синтез АТФ при использовании этого средства происходил при увеличении активности реакций окислительного фосфорилирования, на что указывало повышение уровня изоцитрата,

малата и аспартата (соответственно на 68 %, $p < 0,001$; 77,7 %, $p < 0,001$ и 47 %, $p < 0,001$). Важным моментом в действии прамирацетама на энергетический обмен в условиях аллоксанового диабета было снижение на 31,8 % ($p < 0,001$) продукции лактата при умеренном повышении (на 25 %, $p < 0,05$) содержания пирувата.

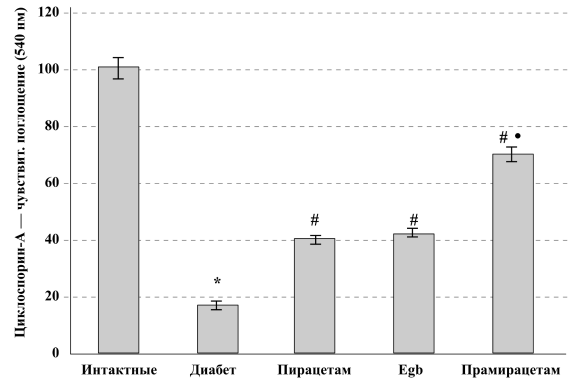


Рис. 1. Влияние ноотропных средств на открытие митохондриальной поры нейроцитов крыс с аллоксановым диабетом.

* — $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; # — $p < 0,05$ по отношению к группе животных с аллоксановым диабетом; • — $p < 0,05$ по отношению к группе животных, получавшим пирацетам и экстракт гинко билоба.

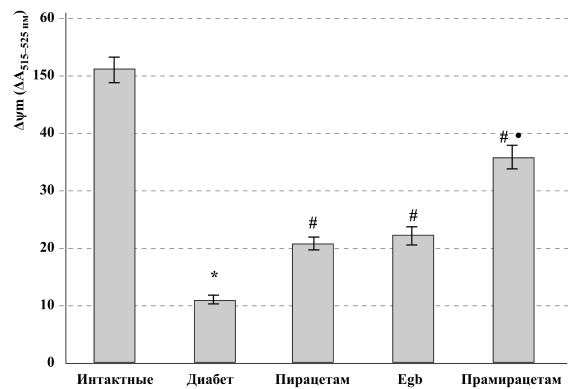


Рис. 2. Влияние ноотропных средств на митохондриальный трансмембранный потенциал нейроцитов крыс с аллоксановым диабетом.

* — $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; # — $p < 0,05$ по отношению к группе животных с аллоксановым диабетом; • — $p < 0,05$ по отношению к группе животных, получавшим пирацетам и экстракт гинко билоба.

Энергетический дефицит, образовавшийся в условиях гипергликемии, способствовал развитию митохондриальной дисфункции в нейронах головного мозга крыс. Установлено, что аллоксановый диабет потенцировал открытие циклоспорин-А-зави-

Влияние пирацетама, экстракта гинко билоба и прамирацетама на некоторые показатели энергетического метаболизма в головном мозге крыс с экспериментальным диабетом

Группа животных	Интактные (n = 10)	Аллоксановый диабет (n = 10)	Пирацетам (n = 10)	EGb 761 (n = 10)	Прамирацетам (n = 10)
АТФ, мкм/г	3,57 ± 0,11	1,16 ± 0,11*	1,63 ± 0,25 [#]	1,62 ± 0,08 [#]	2,02 ± 0,22 [#]
АДФ, мкм/г	0,43 ± 0,010	0,13 ± 0,041*	0,14 ± 0,023	0,13 ± 0,022	0,28 ± 0,049 [#]
АМФ, мкм/г	0,09 ± 0,035	0,16 ± 0,015*	0,15 ± 0,024	0,14 ± 0,021 [#]	0,11 ± 0,024 [#]
Лактат, мкм/г	2,42 ± 0,09	6,38 ± 0,62*	6,16 ± 0,16	6,25 ± 0,39	4,35 ± 0,53 [#]
Пируват, мкм/г	0,17 ± 0,014	0,08 ± 0,011*	0,08 ± 0,012	0,08 ± 0,009	0,10 ± 0,016 [#]
Изоцитрат, мкм/г	0,61 ± 0,073	0,25 ± 0,050*	0,29 ± 0,076	0,31 ± 0,060	0,42 ± 0,065 [#]
Малат, мкм/г	0,71 ± 0,046	0,27 ± 0,055*	0,29 ± 0,044	0,36 ± 0,047 [#]	0,48 ± 0,058 [#]
Аспартат, мкм/г	16,6 ± 0,97	8,3 ± 1,11*	8,4 ± 0,85	8,8 ± 0,74	12,2 ± 1,31 [#]

Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; [#] — $p < 0,05$ по отношению к группе животных с аллоксановым диабетом.

символ поры и способствовал падению $\Delta\psi_m$ в митохондриях нейронов головного мозга (см. рис. 1 и рис. 2). В то же время применение исследуемых средств в условиях экспериментальной патологии поджелудочной железы достоверно тормозило открытие митохондриальной поры. Пирацетам и экстракт гинко билоба проявляли сопоставимую активность, однако по выраженности эффекта в 1,67 раза ($p < 0,001$) уступали прамирацетаму (рис. 1). В ходе эксперимента также отмечено и положительное влияние исследуемых средств на состояние трансмембранного потенциала митохондрий, вызванное введением в среду сафрина О (рис. 2).

Таким образом, аллоксановый диабет

приводит к снижению активности реакций окислительного фосфорилирования, повышению гликолиза и дефициту макроэргических фосфатов в нейронах головного мозга, что, в свою очередь, способствует развитию митохондриальной дисфункции, проявляющейся открытием циклоспорин-А-чувствительной митохондриальной поры, а также падением митохондриального трансмембранного потенциала. Использование ноотропов у животных с аллоксановым диабетом содействует уменьшению проявлений митохондриальной дисфункции, а также нормализует течение биоэнергетических процессов в ЦНС (образование АТФ в реакциях гликолиза и в цикле Кребса).

ВЫВОДЫ

1. Аллоксановый диабет способствует развитию дефицита макроэргических фосфатов в нейронах головного мозга крыс, а также открытию циклоспорин-А-чувствительной поры и падению митохондриального трансмембранного потенциала.
2. Применение ноотропных средств в разной степени уменьшает выраженность явлений митохондриальной дисфункции и энергетического дефицита в ткани головного мозга крыс с аллоксановым диабетом.

3. По степени убывания нейропротекторного потенциала в условиях экспериментального диабета изученные сред-

ства можно расположить следующим образом: прамирацетам > экстракт гинкго билоба ≥ пирацетам.

ЛИТЕРАТУРА

- Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease [Text] / Y. Liu, F. Liu, I. Grundke-Iqbal [et al.] // J. Neurochem. — 2009. — Vol. 111, № 1. — P. 242–249.
- Experimental diabetes mellitus exacerbates tau pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [Text] / Y. D. Ke, F. Delerue, G. Aladbach [et al.] // PLoS One. — 2009. — Vol. 4, № 11. — P. 7917.
- Umegaki H. Patophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? [Text] / H. Umegaki // Age Ageing. — 2010. — Vol. 39, № 1. — P. 8–10.
- Curcuminoids modulates oxidative damage and mitochondrial dysfunction in diabetic rat brain [Text] / M. Rastogi, R. P. Ojha, G. V. Rjamanickam [et al.] // Free Radic. Res. — 2008. — Vol. 42, № 11–12. — P. 999–1005.
- Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease and diabetes [Text] / P. I. Moreira, S. M. Cardoso, C. M. Pereira [et al.] // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. — 2009. — Vol. 18, № 6. — P. 492–511.
- Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats [Text] / R. Mastrocola, F. Restivo, I. Vercellinatto, [et al.] // J. of Endocrinology. — 2005. — Vol. 187. — P. 37–44.
- Митохондриальная дисфункция как один из механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний [Текст] / Н. П. Судаков, В. А. Деев, С. Б. Никифоров, Е. А. Девина // Лабораторная диагностика. — 2008. — № 2 (44). — С. 58–65.
- Reddy P. H. Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease [Text] / P. H. Reddy // CNS Spectr. — 2009. — Vol. 14, № 8. — P. 8–13.
- Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином [Текст] / И. Ф. Беленичев, Ю. В. Колесник, С. В. Павлов [и др.] // Международный неврологический журнал. — 2009. — № 4 (20). — С. 20–26.
- Dave K. R. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat [Text] / K. R. Dave, S. S. Katyare // Journal of Endocrinology. — 2002. — V. 175, № 1. — P. 241–250.
- Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory receptors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat [Text] / M. Garcia, A. Moran, E. [et al.] // British Journal of Pharmacology. — 2005. — Vol. 145, № 5. — P. 593–601.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes [Text] / S. Lenzen // Diabetologia. — 2008. — № 51. — P. 216–226.
- Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) [Текст] / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленинградского ун-та. — 1982. — 272 с.
- Захаров Н. Б. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках «Силуфол» [Текст] / Н. Б. Захаров, В. Н. Рубин // Лаб. дело. — 1980. — № 12. — С. 733–738.
- Акопова О. В. Снижение чувствительности митохондрий к Ca^{2+} -зависимому открытию поры в условиях длительной инкубации [Текст] / О. В. Акопова, В. Ф. Сагач // Укр. биохим. журн. — 2004. — Т. 76, № 35. — С. 61–65.
- Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса [Текст] / Е. А. Аверченко, Н. С. Кавок, А. М. Степаненко [и др.] // Біофізичний вісник. — 2009. — № 22 (1). — С. 49–56.

**ВПЛИВ ЗАСОБІВ З НООТРОПНИМИ ТА НЕЙРОПРОТЕКТОРНИМИ
ВЛАСТИВОСТЯМИ НА ПРОЦЕСИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ
ТА ПРОЯВИ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО
МОЗКУ ЩУРІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ**

Жилюк В. І., Мамчур В. Й., Павлов С. В.¹, Бухтіярова Н. В.¹

Дніпропетровська державна медична академія;

¹*Запорізький державний медичний університет*

В експериментальних дослідженнях на щурах з хронічною алоксан-індукованою гіперглікемією встановлено, що застосування протягом 20 днів пірацетаму, прамирацетаму і екстракту гінко білоба різною мірою сприяє зниженню явищ мітохондріальної дисфункції та енергетичного дефіциту в нейронах головного мозку. В основі цих механізмів лежить попередження відкривання мітохондріальної циклоспорин-А-чутливої пори, відновлення мітохондріального трансмембранного потенціалу та підвищення синтезу макроергічних фосфатів. Найбільш вагомий ефект за даних умов виказує прамирацетам.

Ключові слова: алоксановий діабет, мітохондріальна дисфункція, енергетичний обмін, пірацетам, прамирацетам, екстракт гінко білоба.

**ВЛИЯНИЕ СРЕДСТВ С НООТРОПНЫМИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ
СВОЙСТВАМИ НА ПРОЦЕССЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА
И ПРОЯВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В НЕЙРОНАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ**

Жилюк В. И., Мамчур В. И., Павлов С. В.¹, Бухтиярова Н. В.¹

Днепропетровская государственная медицинская академия;

¹*Запорожский государственный медицинский университет*

В экспериментальных исследованиях на крысах с хронической аллоксан-индуцируемой гипергликемией установлено, что применение на протяжении 20 дней пирацетама, прамирацетама и экстракта гинко билоба в различной степени способствует снижению явлений митохондриальной дисфункции и энергетического дефицита в нейронах головного мозга. В основе этих механизмов лежит предупреждение открывания митохондриальной циклоспорин-А-чувствительной поры, восстановление митохондриального трансмембранного потенциала и повышение синтеза макроэргических фосфатов. Наиболее выраженный эффект в данных условиях проявляет прамирацетам.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, митохондриальная дисфункция, энергетический обмен, пирацетам, прамирацетам, экстракт гинко билоба.