

РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ НЕЙРОНОВ КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА В МЕХАНИЗМЕ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ С НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

В. И. Жилюк¹, В. И. Мамчур¹, С. В. Павлов²

Исследования посвящены изучению влияния цитиколина, фенилпирацетама, пентоксифиллина и *N*-фенилацетил-L-пролилглицина на мнестические процессы и функциональное состояние митохондрий в неокортексе крыс с аллоксановой гипергликемией. Оценку влияния препаратов на мнестические процессы проводили с помощью условной реакции пассивного избегания в темно-светлой камере. Регистрировали латентный период и число животных с амнезией навыка на 6 и 20 сут введения препаратов. Функциональное состояние митохондрий оценивали по открытию митохондриальной поры и митохондриальному трансмембранному потенциалу (Ψ) на 20 сут. Установлено, что курсовое применение фенилпирацетама, цитиколина и, в меньшей степени, *N*-фенилацетил-L-пролилглицина, но не пентоксифиллина, улучшало процессы обучения и хранения условного навыка. При этом ноотропная активность изученных средств была сопоставима с их влиянием на функциональное состояние митохондрий нейронов неокортекса крыс с хронической гипергликемией. Степень митопротективной активности (предупреждение открывания митохондриальной циклоспорин-А-чувствительной поры и восстановление митохондриального трансмембранного потенциала) была наибольшей у цитиколина и фенилпирацетама, а наименьшей — у пентоксифиллина.

Ключевые слова: гипергликемия; мнестические функции; митохондрии; ноотропы.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что нарушения окислительно-восстановительного равновесия в органах и тканях организма играют ключевую роль в развитии осложнений сахарного диабета. Несоответствие между процессами образования свободных радикалов и недостаточностью функционирования антиоксидантной системы в процессах их обезвреживания приводит к развитию окислительного стресса (ОС). ОС проявляется увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА), модифицирующих липиды, белки и ДНК и активирующих провоспалительные молекулы, что, в конечном итоге, приводит к повреждению ДНК и апоптозу клетки [9, 13].

Примерно 4 % потребляемого кислорода в митохондриях преобразуется в АФК, которые являются побочными продуктами реакций окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи. В частности, в качестве основных источников генерации АФК рассматриваются митохондриальные комплексы I (НАДН-дегидрогеназа) и III (коэнзим-убихинон-цитохром С редуктаза). Но и дисфункция комплексов II (сукцинат-убихинон оксидоредуктаза) и IV (цитохромоксидаза) так-

же приводит к потере электронов и увеличению продукции АФК [11].

Митохондриальная дисфункция приводит к нарушению обратного захвата, не имеет этиологической и нозологической специфичности и является типичным патологическим процессом. Однако она приводит к нарушению обратного захвата медиаторов (норадреналина, дофамина, серотонина), ионного транспорта, генерации и проведения импульса, синтеза белка, процессов транскрипции и трансляции, активизации “паразитарных” энергопродуцирующих реакций, что способствует существенным энергозатратам в нейрональной клетке [3].

Изложенные факты характеризуют митохондриальную дисфункцию как активное звено патогенеза нейродегенеративных процессов. Это предопределяет необходимость изучения механизмов развития структурно-функциональных нарушений митохондрий в условиях развития нейродегенеративных заболеваний. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о значительном многообразии процессов, способствующих формированию структурно-функциональных нарушений в митохондриях нервных клеток [4].

Экспериментальными и клиническими исследованиями установлено, что сахарный диабет способствует ускорению формирования, а также ухудшению течения болезни Альцгеймера [12]. При этом в основе

¹ ГУ “Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины”, Украина, 49044, Днепропетровск, ул. Дзержинского, 9.

² Запорожский государственный медицинский университет, Украина, 69035, Запорожье, просп. Маяковского, 26.

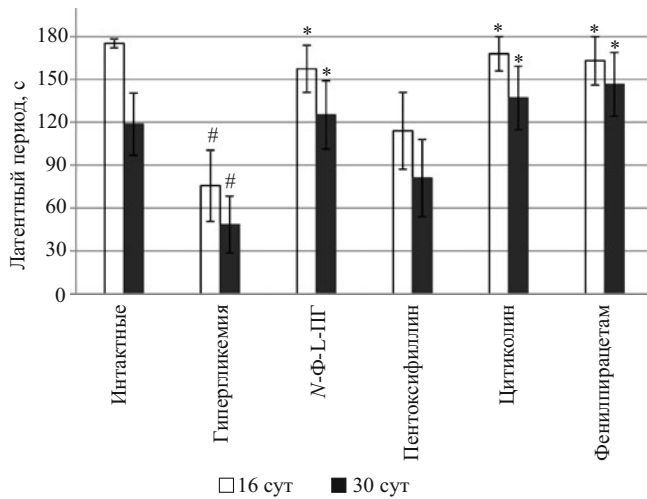


Рис. 1. Показатели латентного периода у животных с аллоксановым диабетом в условиях применения препаратов с нейропротекторными свойствами. Здесь и на рис. 2, 3:

N-ф-*L*-ПГ – *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицин,

$p < 0,05$ — по сравнению с группой интактных животных,

* $p < 0,05$ по сравнению с группой животных с хронической гипергликемией.

развития нейродегенерации может лежать митохондриальная дисфункция [3, 15].

Можно предположить, что дисфункция митохондрий в нейронах головного мозга вносит значительный вклад и в развитие стойкого снижения когнитивных функций у больных сахарным диабетом. Соответственно, проведение фармакотерапии когнитивных нарушений должно учитывать роль митохондриальной дисфункции в механизмах повреждения нервной ткани, а также возможность влияния на эти процессы.

Одним из путей восстановления нарушенных когнитивных функций является назначение ноотропных препаратов, способных активизировать интегративную функцию мозга, оказывать стимулирующее влияние на процесс обучения, улучшать память и умственные способности, особенно при их нарушении, а также повышать устойчивость мозга к влиянию негативных факторов [10].

Целью настоящих исследований было изучение влияния цитиколина, фенилпирацетама, пентоксифиллина и *N*-фенилацетил-*L*-пролилглицина на мнестические процессы и функциональное состояние митохондрий в неокортексе крыс с аллоксановым диабетом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 63 белых крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 330 г (питомник — виварий ГУ “Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины”), содержащихся в стандартных условиях вивария (температура воздуха 22 ± 2 °C, относительная влажность воздуха 40 – 60 %, светлый/темный цикл: 12/12 ч).



Рис. 2. Распределение животных с диабет-ассоциированной амнезией навыка (%) в условиях проводимой экспериментальной нейропротекции.

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

Экспериментальный диабет моделировали однократным подкожным введением аллоксана моногидрата (Sigma, США) в дозе 150 мг/кг в виде 5 % раствора в цитратном буфере (pH 4,5), после предварительной 24-часовой депривации пищи при сохраненном доступе к воде [17].

С целью формирования полного и стабильного диабета животных содержали на протяжении 11 сут на стандартной диете.

Уровень глюкозы крови определяли на 11 сут 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).

Оценку влияния исследуемых препаратов на процессы обучения и хранения условного навыка у крыс проводили с помощью условной реакции пассивного избегания (УРПИ) [8] в темно-светлой камере. Выработку условного рефлекса осуществляли на 5 сут от начала введения препаратов путем нанесения 5 ударов электрическим током силой 1 мА с интервалом 5 с и длительностью каждого импульса 1 с в темной камере. Регистрировали количество животных с амнезией навыка, а также латентный период (ЛП₁) захода в темный отсек до обучения, а также через 24 ч (ЛП₂) и 20 сут (ЛП₃) после введения препаратов.

На 20 сут введения препаратов животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации с последующей декапитацией. Головной мозг извлекали на лед, впоследствии выделяли фрагмент сенсомоторной коры, который промывали 0,15 М KCl (4 °C) и гомогенизировали в 10-кратном объеме раствора для

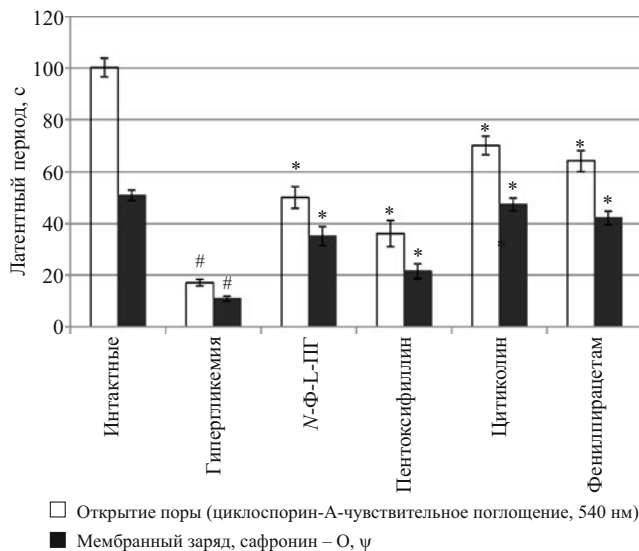


Рис. 3. Влияние ноотропных средств на открытие митохондриальной поры и митохондриальный трансмембранный потенциал нейроцитов крыс с аллоксановым диабетом.

гомогенизации (250 мМ сахараза, 20 мМ трисаминометан, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4).

Функциональное состояние митохондрий оценивали по открытию митохондриальной поры (МП) и митохондриальному трансмембранному потенциалу (Ψ) [1, 6]. Открытие митохондриальной поры инициировали внесением циклоспорина-А (0,5 мл) и определяли спектрофотометрически при $\lambda = 540$ нм при 25 °С и постоянном перемешивании в течение 25 мин. Изучение митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) проводили путем внесения в среду 9 мкМ сафронина О. Спектрофотометрию проводили при длине волны 515 и 525 нм. $\Delta\psi_m$ определяли по разности светопоглощения ($\Delta A_{515-525 \text{ нм}}$). Данный потенциал создается электрохимическим градиентом протонов по обе стороны мембраны и его поддержание обеспечивается процессами переноса электронов в дыхательной цепи. $\Delta\psi_m$ может использоваться для оценки функции митохондрий и состояния клетки в целом [1].

В ходе исследований животные были распределены на 6 групп: I — интактные, $n = 10$; II — животные с аллоксановым диабетом (контроль), $n = 10$; III — диабет + пентоксифиллин в дозе 100 мг/кг $n = 10$; IV — диабет + фенилпирацетам в дозе 100 мг/кг, $n = 10$; V — диабет + цитиколин в дозе 500 мг/кг, $n = 10$ и VI — диабет + N-фенилацетил-L-пролилглицин (ноопепт) в дозе 10 мг/кг, $n = 10$.

Исследуемые препараты вводили внутривенно в указанных дозах 1 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 при комнатном освещении в часовом интервале от 12 до 17 ч.

Полученный цифровой материал обрабатывали стандартными методами с помощью программы статистического анализа StatPlus, AnalystSoft. Версия 2006. (<http://www.analystsoft.com/ru/>) на персональном компьютере “Intel Pentium-IV”. Достоверность отличий средних арифметических (p) определялась с помощью непараметрического U -критерия Манна-Уитни. Для исследования межгрупповых отличий амнезии приобретенного навыка использован точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных нами исследований показали, что через 24 ч после формирования навыка у животных с гипергликемией отмечалось уменьшение на 56,8 % ($p < 0,05$) ЛП₂ захода в темный отсек в сравнении с группой интактных животных, а количество животных с отсутствием выработанного навыка составило 63 % ($p < 0,05$) (рис. 1, 2). К 20 дню исследования (20 сут введения препаратов) в группе интактных животных отмечалось умеренное в 1,32 раза ($p < 0,05$) снижение ЛП₃, при этом процент животных с амнезией составлял 42 %, что свидетельствовало об естественном угасании условного рефлекса при отсутствии подкрепления. Подобная динамика, однако в большей степени выраженности, зафиксирована и у животных с аллоксановым диабетом, у которых ЛП₃ на 59,2 % ($p < 0,05$) был ниже аналогичных значений в группе сравнения в том же временном интервале исследования, а уровень амнезии условного рефлекса составил 82 % ($p = 0,06$) (рис. 1, 2).

Установлено, что курсовое применение препаратов с нейропротекторными свойствами способствовало удлинению ЛП₂ пассивно-оборонительного рефлекса, а также увеличению числа животных с выработанным условным навыком через 24 ч после обучения (рис. 1, 2). Все исследуемые средства, кроме пентоксифиллина, достоверно в 2,1–2,2 раза ($p < 0,05$) повышали значения этого показателя (рис. 1). Это свидетельствовало об улучшении процессов ввода информации в сравнении с группой животных с аллоксановым диабетом. Кроме того, повторное введение цитиколина, фенилпирацетама и N-фенилацетил-L-пролилглицина животным с аллоксановым диабетом предупреждало угасание приобретенного навыка. В сравнении с группой контроля, эти препараты способствовали достоверному, в 2,6 ($p < 0,05$), 2,8 ($p < 0,05$) и 3 ($p < 0,05$) раза, росту значений ЛП₃ (20 сут) у крыс с длительной гипергликемией (рис. 1). В то же время цитиколин и фенилпирацетам в 3,5 раза ($p < 0,05$) и 4 раза ($p < 0,05$) увеличивали количество животных с сохранным условным рефлексом (рис. 2), что указывало на высокий ноотропный потенциал указанных средств при курсовом применении.

Установлено, что нарушение мнестических функций у крыс с гипергликемией сопровождалось проявлениями митохондриальной дисфункции в нейронах коры головного мозга крыс. Обнаружено, что аллоксановый диабет на 83 % ($p < 0,001$) увеличивал открытие циклоспорин-А-зависимой поры и на 78,6 % ($p < 0,001$) способствовал падению трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) в митохондриях нейронов (рис. 3). В то же время проведение лекарственного воздействия во всех случаях приводило к достоверному торможению открытия митохондриальной поры. Однако выраженность проявлений этого эффекта для исследуемых групп была различной, а по степени влияния на этот показатель исследуемые препараты расположились следующим образом: пентоксифиллин $<$ *N*-фенилацетил-L-пролилглицина $<$ фенилпирацетам $<$ цитиколин, которые соответственно в 2,1 ($p < 0,001$), 2,9 ($p < 0,001$), 3,75 ($p < 0,001$) и 4,1 ($p < 0,001$) раза снижали его значения (рис. 3). В ходе эксперимента отмечено и сопоставимое положительное влияние изучаемых препаратов на состояние трансмембранного потенциала митохондрий, вызванное введением в среду сафронина O (рис. 3). Так, по сравнению с группой контроля, пентоксифиллин в 2 ($p < 0,001$), *N*-фенилацетил-L-пролилглицина в 2,9 ($p < 0,001$), фенилпирацетам в 3,9 ($p < 0,001$) и цитиколин в 4,3 ($p < 0,001$) раза повышали значения этого показателя. Следовательно, наибольший потенциал наблюдался у цитиколина и фенилпирацетама, а наименьший — у пентоксифиллина, что в целом сопоставимо с влиянием этих препаратов на мнестические процессы у крыс с диабетической патологией.

Согласно представленным данным экспериментальный диабет у крыс приводит к нарушению мнестических функций и развитию митохондриальной дисфункции в нейронах неокортекса.

Известно, что нейроны головного мозга высокочувствительны к окислительному стрессу и это связано с низким содержанием в них ферментов антиоксидантной защиты, высоким уровнем полиненасыщенных жирных кислот, а также ионов двухвалентного железа, высвобождающихся при повреждении клеток [9, 13].

Митохондрии обеспечивают клетку энергией, являются источником продукции внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) и играют ключевую роль в реализации процессов программированной клеточной гибели — апоптозе. При слабой антиоксидантной защите свободные радикалы повреждают митохондриальные структуры — мембраны, белки, мтДНК — и могут при этом формировать порочный круг, способствуя тем самым увеличению продукции АФК [5, 14].

Основными повреждающими агентами в клетке являются пероксинитрит и гидроксильный радикал. Первый представляет собой соединение, появляющееся вследствие сопряженной реакции супероксидного анион-радикала с оксидом азота [7]. Он подавляет транспорт электронов в митохондриях, принимает

участие в нитрировании остатков тирозина в белках, инициирует перекисное окисление липидов, инактивацию аконитаз, а также окисляет биологические тиолы, являющиеся составляющими основных внутриклеточных антиоксидантных систем организма [7]. Гидроксильный радикал образуется из пероксинитрита и перекиси водорода и способен разрывать любую С-Н и С-С связь [7]. При этом его воздействие может провоцировать открытие митохондриальной поры, которое приводит к значительным потерям пула NAD^+ и последующему выходу в цитозоль проапоптотических белков и инициации апоптоза [3, 11, 16].

Учитывая то, что при сахарном диабете реакции свободно-радикального окисления значительно увеличивают свою интенсивность, они могут способствовать активации процессов нейроапоптоза и являться первопричиной развития стойких нарушений когнитивно-мнестических функций ЦНС [3, 9, 13].

Проводимая экспериментальная терапия, включающая использование истинных ноотропов — ноопепта, фенилпирацетама или цитиколина, у животных с аллоксановым диабетом в значительной степени снижает негативное влияние гипергликемии на когнитивные функции, а также, способствует уменьшению проявлений митохондриальной дисфункции. В то же время применение пентоксифиллина, не являющегося “истинным” ноотропом, не оказывало существенного влияния на мнестические процессы у животных с аллоксановым диабетом. В связи с этим можно предположить, что лекарственные средства с преимущественным сосудистым компонентом действия не способны в достаточной степени корректировать мнестические нарушения на ранних стадиях диабета.

В основе положительного терапевтического действия ноотропов при сахарном диабете могут лежать множественные механизмы, присущие для этой группы препаратов [2]. Однако следует отметить, что полученные данные напрямую могут быть связаны с механизмами, позволяющими этим средствам уменьшать выраженность проявления окислительного стресса и восстанавливать активность антиоксидантных систем в образованиях головного мозга крыс с хронической гипергликемией. Вероятно, благодаря этим эффектам ноотропы могут оказывать митопротекторное действие и тем самым снижать выраженность проявлений нейродеструкции. В последующем это способствует нормализации течения биоэнергетических процессов в ЦНС (образование АТФ в реакциях гликолиза и в цикле Кребса) и оказывает положительное влияние на когнитивные функции.

ВЫВОДЫ

1. Длительная гипергликемия у крыс инициирует развитие мнестических расстройств, связанных с нарушением нейрональной активности, вследствие митохондриальной дисфункции.

2. Цитиколин, фенилпирацетам и *N*-фенилацетил-L-пролилглицина, но не пентоксифиллин, проявляют значимый ноотропный потенциал, сопоставимый с их влиянием на проявления митохондриальной дисфункции в неокортексе крыс с экспериментальным эквивалентом сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. А. Аверченко, Н. С. Кавок, А. М. Степаненко и др., *Биофиз. вестн.*, № 22, 49 – 56 (2009).
2. И. С. Евтушенко, *Международ. неврол. журн.*, № 3, 20 – 27 (2013).
3. И. Ф. Беленичев, Ю. В. Колесник, С. В. Павлов и др., *Международ. неврол. журн.*, № 4, 20 – 26 (2009).
4. Н. П. Судаков, В. А. Бывальцев, С. Б. Никифоров и др., *Журн. неврол. и псих.*, № 9, 87 – 91 (2010).
5. Н. П. Судаков, В. А. Деев, С. Б. Никифоров, Е. А. Девина, *Лаб. диагност.*, № 2, 58 – 65 (2008).
6. О. В. Аكوпова, В. Ф. Сагач, *Укр. биохим. журн.*, 76(35), 61 – 65 (2004).
7. О. В. Занозина, Н. Н. Боровков, Т. Г. Щербатюк, *Соврем. технол. в медицине*, № 3, 104 – 112 (2010).
8. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005).
9. С. Karasu, *Open Cardiovasc. Med. J.*, № 4, 240 – 256 (2010).
10. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 7(4), 44 – 58 (2007).
11. G. X. Shen, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 88, 241 – 248 (2010).
12. H. Umegaki, *Age Ageing*, 39(1), 8 – 10 (2010).
13. J. Tanaka, L. Qiang, A. S. Banks, et al., *Diab.*, 58, 2344 – 2354 (2009).
14. P. H. Reddy, *CNS Spectr.*, 14(8), 8 – 13 (2009).
15. P. I. Moreira, S. M. Cardoso, C. M. Pereira, et al., *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.*, 18(6), 492 – 511 (2009).
16. R. Mastrocola, F. Restivo, I. Vercellinatto, et al., *J. Endocrinol.*, 187, 37 – 44 (2005).
17. S. Lenzen, *Diabetol.*, № 51, 216 – 226 (2008).

Поступила 14.10.14

ROLE OF FUNCTIONAL STATE OF NEURONAL MITOCHONDRIA OF CEREBRAL CORTEX IN MECHANISMS OF NOOTROPIC ACTIVITY OF NEUROPROTECTORS IN RATS WITH ALLOXAN HYPERGLYCEMIA

V. I. Zhyliuk¹, V. I. Mamchur¹, and S. V. Pavlov²

¹ Dnipropetrovsk Medical Academy, Ministry of Health of Ukraine, Dzerzhinsky str. 9, 49044 Dnipropetrovsk, Ukraine;

² Zaporozhye State Medical University, Mayakovsky str. 26, 69035 Zaporozhye, Ukraine

The influence of citicoline, phenylpiracetam, pentoxifylline and *N*-phenylacetyl-L-prolylglycine on cognitive processes and functional state of mitochondria in the neocortex of alloxan-diabetic rats has been studied. The drug effects on cognitive processes were assessed using passive avoidance tests in the dark-light camera. Latent period and the number of animals with amnesia skill on 6th and 20th days of drug administration were recorded. Functional status of mitochondria was assessed by mitochondrial pore opening and mitochondrial transmembrane potential (*Y*) on 20th day. It has been established that course administration of phenylpiracetam, citicoline and to a lesser extent *N*-phenylacetyl-L-prolylglycine, but not pentoxifylline, improves the processes of learning and storing conditional skill. At the same time, the nootropic activity of studied drugs was comparable to their effect on the functional state of mitochondria in neocortical neurons in rats with chronic hyperglycemia. According to mitoprotective activity (prevention of opening of mitochondrial cyclosporin-A-sensitive pores and restoration of mitochondrial transmembrane potential), the maximum potential was observed for citicoline and phenylpiracetam, and the minimum – for pentoxifylline. The results point out the importance of mitoprotective properties in nootropic effects of studied drugs.

Keywords: hyperglycemia; cognitive functions; mitochondria; nootropic drugs.