

ВОПРОСЫ АЛКОГОЛИЗМА

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ ОКИСИ АЗОТА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

И. Ф. Беленичев, Е. П. Соколик¹

При моделировании хронической алкогольной интоксикации в течение 30 дней у крыс отмечено повышение уровня свободных метаболитов окиси азота и NO-синтазы при одновременном снижении показателей L-аргинина, каталазы и супероксиддисмутазы. Последующая 14-дневная терапия нейропептидными церебропротекторами — цереброкурином, кортексином, церебролизином приводила к нормализации показателей системы окиси азота. Наибольшую терапевтическую активность проявил цереброкурин.

Ключевые слова: окись азота, алкоголизация, цереброкурин, нейропротекция

ВВЕДЕНИЕ

Алкоголизм является важной социальной и медицинской проблемой. Ежегодно от острой алкогольной интоксикации погибает около 40 тыс. человек. Еще около 100 тыс. умирают от болезней, связанных с чрезмерным употреблением алкоголя. Этиловый спирт является политропным токсином, но нейроны мозга в наибольшей степени уязвимы для алкоголя [2]. Повреждение структуры клеточных мембран нейронов нарушает их электровозбудимость и препятствует проведению импульса. Алкоголь изменяет состояние белкового компонента мембран, содержание жидкости в них, способность мембран к транспорту ионов, что приводит к набуханию нейронов и астроцитов, повреждению легко уязвимых клеток, выстилающих капилляры [4]. Разрыв нейротрансмиттерных путей блокирует постсинаптические рецепторы, провоцирует ложные нейротрансмиттерные эффекты и нарушает синтез, накопление, высвобождение, поглощение или ферментную инактивацию нейротрансмиттеров [1]. В предыдущих исследованиях нами получены данные о повышении NO-синтазной активности при экспериментальном алкоголизме. На сегодняшний день отсутствует специфическая терапия энцефалопатии алкогольного генеза. Поэтому актуальным является поиск новых способов фармакокоррекции патологии ЦНС, вызванных хронической алкогольной интоксикацией. Нами получены данные о нейропротекторных свойствах препаратов пептидной структуры (цереброкурин, кортексин, церебролизин) в условиях экспериментальной алкогольной интоксикации. Исходя из этого, цель

нашего исследования — установить особенности и степень выраженности действия цереброкурина, кортексина и церебролизина на систему окиси азота в нейронах головного мозга при экспериментальной алкогольной интоксикации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали 50 белых беспородных крыс-самцов с массой тела 180–220 г в возрасте 4,5 мес, которых содержали в виварии при свободном доступе к пище (стандартный гранулированный корм) и воде, при естественной смене дня и ночи. Животные были получены из питомника ГУ “Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины”. Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с “Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях” [8, 11].

Хроническую алкогольную интоксикацию 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-х суток прекращали алкоголизацию, проводили терапию изучаемыми препаратами и продолжали наблюдение в течение 14 дней. Все крысы были разделены на 5 групп по 10 животных в каждой группе. 1-я группа получала в течение 30 дней этанол и с 31 по 44-е сутки цереброкурин в дозе 0,06 мг/кг. 2-я группа получала в течение 30 дней этанол и с 31 по 44-е сутки церебролизин в дозе 4 мг/кг. 3-я группа получала в течение 30 дней этанол и с 31 по 44-е сутки кортексин в дозе 0,5 мг/кг. 4-я группа получала в течение 30 дней этанол (контроль). 5-я группа — вместо этанола получала физиологический раствор [5, 4].

¹ Кафедра фармакологии и врачебной рецептуры (зав. — проф. И. Ф. Беленичев) Запорожский государственный медицинский университет, 69035, Запорожье, Украина, пр. Маяковского, 26, E-mail: sokoliker@gmail.com, ifb1914@mail.ru

Цереброкурин — нейропептид нового поколения, полученный из эмбрионов крупного рогатого скота. Представляет собой белую, слегка желтоватую прозрачную жидкость, рН 6,1 – 6,4. Цереброкурин содержит свободные аминокислоты, нейропептиды и низкомолекулярные продукты контролируемого протеолиза низкомолекулярных белков и пептидов эмбрионов крупного рогатого скота. Цереброкурин безопасен с точки зрения прионного вирусносительства, т.к. препарат пропускается через систему специальных фильтров, а для его производства используют эмбрионы животных одного хозяйства. Как известно, именно эмбрион на раннем этапе онтогенеза содержит наибольшую концентрацию регуляторных нейропептидов, которые при соответствующей технологической обработке составляют основу цереброкурина. В исходную суспензию препарата могут попадать и нейроblastные стволовые клетки. Регуляторные нейропептиды, составляющие основу препарата, способствуют ремиелинизации, глиальной пролиферации и регенерации новых нейронов. Производитель: ООО “НИР”, Украина, Киев. Цереброкурин содержит нейропептиды, в том числе и белки S-100, рилин, фактор роста нервов (NGF) (не менее 2 мг/мл), аминокислоты: аспарагиновую кислоту (446 нмоль/мг), треонин (212 нмоль/мг), серин (268 нмоль/мг), глутаминовую кислоту (581 нмоль/мг), пролин (187 нмоль/мг), глицин (298 нмоль/мг), аланин (346 нмоль/мг), валин (240 нмоль/мг), изолейцин (356 нмоль/мг), тирозин (109 нмоль/мг), фенилаланин (162 нмоль/мг), гистидин (116 нмоль/мг), лизин (253 нмоль/мг), аргинин (202 нмоль/мг). В препарате присутствуют NaCl 0,9 %, хиназол 0,1 %. Эффекты цереброкурина, связанные с повышением пластичности нейронов, могут “опираться” в своем действии не только на мембранную фракцию пептидов, но и на гетерогенную фракцию нейрон-специфических липидов.

1 мл раствора для инъекций церебролизина содержит 215,2 мг комплекса пептидов, полученных из мозга свиньи; производитель “Ebeve”, Австрия [7].

Кортексин — препарат полипептидной природы, получаемый путем экстракции из коры большого мозга крупного рогатого скота; его ингредиенты представ-

лены L-аминокислотами, витаминами и минеральными веществами; производитель — “Герофарм”, Россия.

Активность NO-синтазы и L-аргинина определяли флюорометрическим способом [10]. Уровень каталазы определяли спектрофотометрически [9]. Определяли также показатели супероксиддисмутазы (СОД) [12]. Свободные метаболиты NO определяли по методике Грисса [6]. Количественное определение нитрозиловых протеинов проводили с помощью ELISA-набора NITROTYROSINE (набор № НК501, серия 4513K19). ELISA-набор NITROTYROSINE представляет твердофазовый энзимсвязывающий иммуносорбентный набор, который работает по принципу “сендвича”.

Сравнение групп проводили при помощи критерия t-Стьюдента. 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

При формировании у крыс хронической алкогольной интоксикации было отмечено повышение уровня нитротирозина, стабильных метаболитов окиси азота и активности NO-синтазы при параллельном снижении содержания L-аргинина и активности каталазы и супероксиддисмутазы по сравнению с интактной группой.

Это свидетельствует о том, что в условиях хронической алкогольной интоксикации в нервной ткани формируется неблагоприятный метаболический фон, приводящий к развитию “нитрозирующего стресса”. “Нитрозирующий стресс” приводит к гиперпродукции цитотоксических дериватов окиси азота — иона нитрозония, пероксинитрита, которые атакуют белковые молекулы, образуя о-тирозин, 6-нитротриптофан, 3-нитротирозин, 3-хлортирозин, 2-оксогистидин, а также разнообразные карбонильные производные. N-, S-нитрозирование белковых фрагментов мембран нейронов ухудшает чувствительность и специфичность рецепторов, генерацию, образование и проводимость нервного импульса, нарушает синаптическую переда-

Показатели системы окиси азота в головном мозге крыс на фоне 30-дневной хронической алкогольной интоксикации и последующего 14-дневного лечения

Группа животных (n = 10)	Свободные метаболиты окиси азота (NO ₂ ⁻), мкМ/г	NO-синтаза, нмоль/мг/белка/мин	L-аргинин, мкмоль/г ткани	Каталаза, мкат/мг белка	СОД, у. е./мг белка/мин	Нитротирозин мозга, нмоль/г белка
Интактные	4,04 ± 0,83	2,01 ± 0,37	3,64 ± 0,52	7,81 ± 1,34	243,17 ± 51,58	17,23 ± 3,05
Контроль	14,08 ± 2,6	5,02 ± 0,97	0,72 ± 0,13	2,06 ± 0,34	81,67 ± 14,85	144,27 ± 28,56
Церебролизин	9,86 ± 1,4*	3,56 ± 0,75*	1,69 ± 0,34*	4,26 ± 0,74*	155,33 ± 29,42*	110,55 ± 19,90*
Кортексин	8,18 ± 1,24*	3,01 ± 0,52*	2,13 ± 0,37*	5,21 ± 1,83*	201,26 ± 45,05*	87,71 ± 23,46*
Цереброкурин	6,39 ± 1,18*	2,03 ± 0,29*	3,07 ± 0,6*	7,17 ± 1,42*	240,7 ± 46,47*	25,26 ± 2,63*

* — p < 0,05 относительно контрольной группы.

чу [5]. Эти изменения приводят к нарушению секреторной, инкреторной, транспортной функции нейронов, а также к снижению когнитивно-мнестических функций организма [1–3].

Курсовое назначение нейропептидов привело к тому, что уровень свободных метаболитов NO и NO-синтазы снизился соответственно в группе церебролизина на 29,97 и 29,08 %, кортексина на 41,9 и 40,04 %, цереброкурина на 54,62 и 59,56 % достоверно по отношению к группе контроля. Уровень нитротирозина в мозге крыс в группе церебролизина на 23,37 % ниже по отношению к группе контроля, в группе кортексина — на 39,20 %, а в группе цереброкурина — на 82,49 % достоверно ниже по отношению к контролю. Снижение маркеров “нитрозирующего стресса” наблюдалось на фоне повышения уровня L-аргинина, активности каталазы и СОД — в группах, получавших церебролизин, на 134,72; 106,8 и 90,19 %, кортексин на 195,83; 152,91 и 146,43 %, цереброкурин на 326,39; 248,1 и 194,72 % по сравнению с группой контроля (таблица).

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной положительной динамике биохимических показателей в мозге животных, получавших на фоне алкогольной интоксикации нейротрофическую терапию.

Результаты исследования определили терапевтически наиболее активный препарат — цереброкурин, который значительно эффективнее привел к регрессии образования нитротирозина, свободных метаболитов NO и NO-синтазы, повысил синтез L-аргинина, активность каталазы и СОД.

Нашими предыдущими исследованиями, а также работами других авторов доказано, что цереброкурин тормозит перекисидацию мембранных фосфолипидов, тормозит активность липоксигеназы в каскаде арахидоновой кислоты, блокирует продукцию O_2^{\bullet} и ОСГ активированными лейкоцитами, ингибирует индуцибельную NO-синтазу и защищает от действия $ONOO^-$. Цереброкурин тормозит экспрессию провоспалительных цитокинов, уменьшает степень цитотоксического отека. Установлено, что препарат опосредованно, через снижение уровня АФК, тормозит выработку факторов транскрипции и в дальнейшем снижает экспрессию генов, ответственных за синтез индуцибельной

NO-синтазы [1, 3]. Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием применения цереброкурина и других нейропептидов в комплексной терапии алкогольной энцефалопатии с целью коррекции молекулярно-биохимических нарушений и улучшения церебральных функций.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к стойким нарушениям в системе окиси азота и развитию “нитрозирующего стресса” в головном мозге.

2. Курсовое назначение церебролизина, кортексина и цереброкурина ограничивает повреждающее действие “нитрозирующего стресса”. Наиболее выраженный терапевтический эффект наблюдается при назначении цереброкурина.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Ф. Беленичев, Н. В. Бухтиярова, Д. А. Середа, *Новости медицины и фармации*, № 5(237), 1 – 7 (2008).
2. И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Е. П. Соколик, Н. В. Бухтиярова, *Межд. неврол. журн.*, № 1(23), 116 – 180 (2009).
3. И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник, *Рациональная нейропротекция*, издатель Заславский А. Ю., Донецк (2009).
4. И. Ф. Беленичев, Е. П. Соколик, *Фармакология и врачебная токсикология*, № 1 – 2, 11 – 16 (2010).
5. И. Ф. Беленичев, Е. П. Соколик, *Патология*, 7, № 2, 50 – 53 (2010).
6. Н. В. Горбунов, *Бюл. exper. биол.*, № 7, 40 – 48 (1995).
7. О. А. Громова, А. С. Катаев, В. Е. Третьяков, С. А. Машковский, *Межд. неврол. журн.*, 2(6) (2006).
8. Ю. М. Кожемякин, О. С. Хромов, М. А. Филоненко, Г. А. Сайфетдинова, *Научно-практические рекомендации по содержанию лабораторных животных и работе с ними*, Киев (2002).
9. Ю. М. Колесник, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, С. В. Павлов, Патент № 13132 (Украина), МПК JOIN 33/48, (UA), № 200509119 (2005).
10. М. А. Корольок, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1998).
11. Р. У. Хабриев, *Рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств*, Москва (2005).
12. С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей, *Лаб. дело*, № 11, 678 – 681 (1985).

Поступила 28.03.11

PHARMACOLOGICAL MODULATION OF NITROGEN OXIDE SYSTEM IN EXPERIMENTAL CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION IN RATS

I. F. Belenichev and E. P. Sokolik

Zaporozhye State Medical University, pr. Mayakovskogo 26, 69035 Zaporozhye, Ukraine
e-mail: sokolikep@gmail.com; ifb1914@mail.ru

The modeling of chronic alcohol intoxication for 30 days in rats leads to an increase in the level of free metabolites of nitrogen oxide and NO-synthase with simultaneous decrease in the levels of L-arginine, catalase, and superoxide dismutase. The subsequent 14-day treatment with neuropeptide cerebroprotectors cerebrocurin, cortexin, and cerebrolysin led to normalization of the parameters of nitrogen oxide system. The maximum therapeutic activity was shown by cerebrocurin, which can be recommended for inclusion as component of alcoholic encephalopathy treatment.

Key words: Nitric oxide, alcoholic encephalopathy, cerebrocurin, neuroprotection