

УДК 615.214+615.252.349.7+615.32+615.22:616.831.4:616.379-008.64-092.9

Abstract

Zhyliuk V. I. *, Mamchur V. I.,
Lievkyh A. E., Petruk N. S.,
Dnipropetrovsk Medical Academy
of Ministry of Health of Ukraine,
9 Dzerzhynskoho St.,
Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine

CEREBROPROTECTIVE ACTIVITY OF PIRACETAM UNDER COADMINISTRATION WITH HYPOGLYCEMIC, ANTIOXIDANT OR ANTIPLATELET DRUGS IN EXPERIMENTAL DIABETES

The paper presents the results of research of piracetam cerebroprotective activity under coadministration with hypoglycemic, antioxidant or antiplatelet drugs in rats with hyperglycemia.

Research was carried out on 70 white rats weighing 250–300 g. Experimental diabetes was initiated by subcutaneous injection of alloxan monohydrate. On the 11th day after administration of alloxan the animals were randomized in 7 groups: I – intact (distilled water); II – diabetes (distilled water); III – diabetes + piracetam (500 mg/kg); IV – diabetes + piracetam (400 mg/kg) + metformin (500 mg/kg); V – diabetes + piracetam (400 mg/kg) + pioglitazone (10 mg/kg); VI – diabetes + piracetam (400 mg/kg) + thiotriazoline (100 mg/kg); VII – diabetes + piracetam (400 mg/kg) + acetylsalicylic acid (50 mg/kg). Experimental combinations and distilled water were administered intragastrically for 20 days.

We assessed content of protein oxidative modification markers and total level of nitrates/nitrites in homogenates of neocortex using spectrophotometric analysis. Ultrastructural studies of neocortical tissue were performed using a transmission electron microscope TEM-100-01 according to the standard plan.

We found that experimental model of diabetes was accompanied by the development of carbonyl stress and led to overproduction of nitric oxide in neocortex. Piracetam, when used with metformin, thiotriazoline or acetylsalicylic acid, significantly reduced content of early and late markers of protein molecules degradation (aldehydephenylhydrazones and ketonephenylhydrazones) and decreased level of nitric oxide stable metabolites. Coadministration of piracetam with pioglitazone did not result in considerable effect on content of these substances. We established that the use of all experimental drug combinations did not provide full recovery of ultrastructural changes in the neocortex; however, coadministration of piracetam with thiotriazolin, acetylsalicylic acid and metformin, but not with pioglitazone, led to a significant limitation of destructive changes in neurons and synaptic mechanism. Cerebroprotective activity of the combinations did not depend on the presence of hypoglycemic properties.

Key words: piracetam, metformin, pioglitazone, thiotriazoline, acetylsalicylic acid, protein oxidative modification, nitric oxide, diabetes, neocortex.

Corresponding author: * vzhyliuk@gmail.com

Резюме

Жилюк В. І. *, Мамчур В. Й.,
Левих А. Е., Петрук Н. С.,
Дніпропетровська медична
академія Міністерства охорони
здоров'я України,
вул. Дзержинського, 9,
Дніпропетровськ, 49044,
Україна

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНА АКТИВНІСТЬ ПІРАЦЕТАМУ ЗА УМОВ СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ З ГІПОГЛІКЕМІЧНИМИ, АНТИОКСИДАНТНИМИ ЧИ АНТИАГРЕГАНТНИМИ ЗАСОБАМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ДІАБЕТИ

У роботі подані результати досліджень церебропротективної активності пірацетаму за умов сумісного введення з гіпоглікемічними, антиоксидантними чи антиагрегантними засобами щурам із гіперглікемією.

Дослідження проведені на 70 білих щурах масою 250–300 г. Експериментальний діабет ініціювали підшкірним введенням алоксану моногідрату. На 11-ту добу після введення алоксану, тварини були рандомізовані на групи: I – інтактні (дистильована вода); II – діабет (дистильована вода); III – діабет + пірацетам (500 мг/кг); IV – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + метформін (500 мг/кг); V – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + піоглітазон (10 мг/кг); VI – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + тіотриазолін (100 мг/кг); VII – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + ацетилсаліцилова кислота (50 мг/кг). Дослідні комбінації, а також дистильована вода вводилися внутрішньошлунково впродовж 20 діб.

Спектрофотометрично в гомогенатах неокортексу визначали вміст маркерів окисної модифікації білка та сумарний рівень нітратів і нітритів. Ультраструктурні дослідження тканини неокортексу проведені за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 за стандартною схемою.

Установлено, що експериментальне відтворення діабету супроводжувалося розвитком карбонільного стресу та приводило до гіперпродукції оксиду азоту в неокортексі. Водночас, пірацетам при сумісному використанні з метформіном, тіотриазоліном чи ацетилсаліциловою кислотою, значно знижував вміст ранніх і пізніх маркерів деструкції білкових молекул – альдегідфенілгідрозонів та кетонфенілгідрозонів, а також вміст стабільних метаболітів оксиду азоту. При цьому використання пірацетаму разом із піоглітазоном не виявляло істотно не впливали на вміст цих біологічних речовин. Також визначено, що використання усіх дослідних комбінацій не забезпечувало повного відновлення ультраструктурних змін у неокортексі, однак при введенні пірацетаму з тіотриазоліном, ацетилсаліциловою кислотою та метформіном, але не з піоглітазоном, спостерігалось істотне обмеження проявів деструктивних змін нейронів і синаптичного апарату. Характерно, що церебропротективна активність комбінацій не залежала від наявності гіпоглікемічних властивостей.

Ключові слова: пірацетам, метформін, піоглітазон, тіотриазолін, ацетилсаліцилова кислота, окисна модифікація білка, оксид азоту, цукровий діабет, неокортекс.

Резюме

Жилюк В. І. *, Мамчур В. Й.,
Левых А. Э., Петрук Н. С.,
Днепропетровская медицинская
академия Министерства
здравоохранения Украины,
ул. Дзержинского, 9,
Днепропетровск, 49044, Украина

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПИРАЦЕТАМА В УСЛОВИЯХ СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ С ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИМИ, АНТИОКСИДАНТНЫМИ ИЛИ АНТИАГРЕГАНТНЫМИ СРЕДСТВАМИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

В работе представлены результаты исследований церебропротективной активности пирацетама при совместном введении с гипогликемическими, антиоксидантными или антиагрегантными средствами крысам с гипергликемией.

Исследования проведены на 70 белых крысах массой 250–300 г. Экспериментальный диабет инициировали подкожным введением алоксана моногидрата. На 11-е сутки после введения алоксана животные были распределены на группы: I – интактные (дистиллированная вода); II – диабет (дистиллированная вода); III – диабет + пирацетам (500 мг/кг); IV – диабет + пирацетам (400 мг/кг) + метформин (500 мг/кг); V – диабет + пирацетам (400 мг/кг) + пиоглитазон (10 мг/кг); VI – диабет + пирацетам (400 мг/кг) + тиотриазолин (100 мг/кг); VII – диабет + пирацетам (400 мг/кг) + ацетилсалициловая кислота (50 мг/кг). Исследуемые комбинации, а также дистиллированная вода вводились внутривентрикулярно в течение 20 суток.

Спектрофотометрически в гомогенатах неокортекса определяли содержание маркеров окислительной модификации белка и суммарный уровень нитратов и нитритов. Ультраструктурные исследования ткани неокортекса проведены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-100-01 по стандартной схеме.

Установлено, что течение экспериментального диабета сопровождалось развитием карбонильного стресса и приводило к гиперпродукции оксида азота в неокортексе. В то же время пирацетам при совместном использовании с метформином, тиотриазолином или ацетилсалициловой кислотой, значительно снижал содержание ранних и поздних маркеров деструкции белковых молекул – альдегидфенилгидразонов и кетонфенилгидразонов, а также содержание стабильных метаболитов оксида азота. При этом совместное использование пирацетама с пиоглитазоном не оказывало значимого влияния на содержание этих биологических веществ. Определенно, что введение всех исследуемых комбинаций лекарственных средств не обеспечивало полное восстановление ультраструктурных изменений в неокортексе, однако при введении пирацетама с тиотриазолином, ацетилсалициловой кислотой или метформином, но не с пиоглитазоном, наблюдалось существенное ограничение проявлений деструктивных изменений нейронов и синаптического аппарата. Характерно, что церебропротективная активность комбинаций не зависела от наличия гипогликемических свойств.

Ключевые слова: пирацетам, метформин, пиоглитазон, тиотриазолин, ацетилсалициловая кислота, окислительная модификация белка, оксид азота, сахарный диабет, неокортекс.

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) є однією з найбільш поширених на земній кулі ендокринних патологій, а діабетична нейропатія є найбільш поширеним ускладненням і лідером серед причин зниження якості життя хворих на це захворювання [1, 2]. Серед нейропатій у 78 % хворих на ЦД виділяється діабетична енцефалопатія [2–4].

Відомо, що в основі патогенезу діабетичної нейрональної патології лежить гіперглікемія, яка сприяє значному (до чотирьох разів) зростанню нейрональних рівнів глюкози з подальшим порушенням її внутрішньоклітинного метаболізму і ушкодженням нейронів [5]. У результаті цього розвиваються вторинні процеси у вигляді оксидативного стресу та глікозилювання протеїнів. Водночас, головний мозок особливо чутливий до вільних радикалів, адже їх гіперпродукція призводить до деструкції клітинних мембран, у результаті активації фосфоліпазного гідролізу [6].

Важливим напрямом у лікуванні нейропатії є розроблення комплексної програми терапії, яка б дозволила впливати на множинні ланки патогенезу в процесі розвитку цього стану. Водночас правильно вибрана терапевтична тактика у хворих на цукровий діабет здатна забезпечити соціальну адаптацію цих пацієнтів та значно покращити якість їх життя.

Однак існують відомості, згідно з якими використання гіпоглікемічних засобів не захищає від розвитку діабет-асоційованого когнітивного дефіциту. Це підтверджено як клінічними, так і експериментальними дослідженнями останніх років [7, 8].

У даному випадку доцільним є використання церебропротекторів. Важливою вимогою для цих засобів є наявність антиоксидантної активності поряд з протишемічною дією.

Метою проведеного дослідження було визначення впливу пірацетаму та його комбінацій з гіпоглікемічними, антиоксидантними чи антиагрегантними засобами на процеси окисної модифікації білка (ОМБ), системну продукцію оксиду азоту у неокортексі шурів з експериментальним еквівалентом цукрового діабету.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на 70 білих щурах-самцях масою 250–300 г, що утримувались у

стандартних умовах віварію ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (температура повітря: (22 ± 2) °С, світло/темрява: 12/12 годин).

Усі експериментальні процедури здійснювали згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних досліджах» [15].

Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату (Sigma, США) в дозі 150 мг/кг у вигляді 5 % розчину в цитратному буфері, рН 4,5 після попередньої 24-годинної депривації їжі (при вільному доступі до води) [9, 10]. Для зменшення загибелі тварин внаслідок гіпоглікемічного шоку після введення алоксану, щури упродовж 24 год після індукції діабету замість води отримували 5 % розчин глюкози.

Рівень глюкози крові визначали на 11-ту добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для подальших досліджень залучені лише тварини з підвищеним рівнем глюкози (> 11 ммоль/л) [9].

У подальшому тварини були рандомізовані на групи по 10 тварин: I – інтактні (пасивний контроль, дистильована вода); II – тварини з алоксановим діабетом (активний контроль, дистильована вода); III – діабет + пірацетам (500 мг/кг); IV – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + метформін (500 мг/кг); V – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + піоглітазон (10 мг/кг); VI – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + тіотриазолін (100 мг/кг); VII – діабет + пірацетам (400 мг/кг) + ацетилсаліцилова кислота (50 мг/кг).

В експерименті використані такі препарати: метформін (Сіофор® 500, Берлін-Хемі АГ/Менаріні Груп, Німеччина), піоглітазон (Піоз®, ЮСВ Лтд., Індія), пірацетам/тіотриазолін, 200/50 мг (Тіоцетам®, АТ «Галичфарм», Україна), пірацетам (Луцетам® 800, Egis, Угорщина), ацетилсаліцилова кислота (АСК) (Аспірін Кардіо®, Bayer Consumer Care, Німеччина).

Лікарські засоби вводили 1 раз на добу впродовж 20 днів, починаючи з 11 дня після введення алоксану, встановлення рівня гіперглікемії та розподілу на групи. Інтактним тваринам (n = 10) і тваринам активного контролю (n = 10) у відповідному режимі

внутрішньошлунково вводили дистильовану воду.

Інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення оцінювали за вмістом маркерів окисної модифікації білка (ОМБ) – альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і кетонфенілгідрозонів (КФГ) [11]. Обмін оксиду азоту (NO) оцінювався за сумарним рівнем нітратів і нітритів (NO_x), які визначали, попередньо проводячи конверсію нітратів в нітрити, за допомогою реакції Грися [12, 13]. Вміст зазначених маркерів у неокотексі визначали спектрофотометрично.

Вміст глюкози у сироватці крові визначали глюкозооксидазним методом [14].

Для ультраструктурного дослідження отримані зразки гіпокампа та кори головного мозку впродовж 3–4 годин фіксували при +2°C в 2,5 % розчині глютаральдегіду, виготовленому на 0,2 М фосфатному буфері (pH7,3). Подальша фіксація проводилася в 1 % забуференому (pH7,4) розчині тетраоксиду осмію («SPI», США) впродовж 1 години. Зневоднювання зразків тканин проводили в спиртах зростаючої концентрації та завершали трьома змінами пропіленоксиду. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію Епон-812 («SPI-Pon™ 812 Epoxy Embedding Kit», США). Перед приготуванням ультратонких зрізів попередньо проводили аналіз напівтонких зрізів на основі методу світлової мікроскопії. Виготовлення ультратонких зрізів товщиною 60–80 нм проводили на ультрамікротомі УМТП-6 М («SELMIT», Україна) з подальшим їх розміщенням на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200). Подвійне контрастування проводили 2 % водним розчином уранілацетату впродовж 15 хв при температурі + 37 °С з подальшою імпрегнацією розчином цитрату свинцю за методом Рейнольдса впродовж 30 хв [20]. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 («SELMIT», Україна) з напругою прискорення 70–75 кВ і первинних збільшеннях від 4000 до 20000 за стандартною схемою. Підготовку матеріалу для ультраструктурного аналізу проводили згідно із загальноприйнятими стандартами [21, 22]. Оцінку ультраструктурних змін проводили за аналізом особливостей змін нейронального та гліального компонентів кори великих півкуль.

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики за допомогою

програми статистичного аналізу StatPlus, AnalystSoft. Версія 2006 (див. <http://www.analystsoft.com/ru/>) на персональному комп'ютері «Intel Pentium-IV». Математична обробка передбачала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їх похибок ($\pm m$), ймовірність різниці середніх арифметичних (p) за допомогою непараметричного – U-критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

Установлено, що перебіг алоксанового діабету значно прискорює інтенсивність процесів ОМБ і продукцію оксиду азоту в корі головного мозку. Доказом цього було зростання концентрації АФГ та КФГ на 82,2 % ($p < 0,001$) і 44,3 % ($p < 0,001$) відповідно та рівня NO_x у 2,05 раза ($p < 0,001$) порівняно з даними інтактних тварин (пасивний контроль) (рис. 1). Водночас активізація реакцій вільнорадикального окиснення супроводжувалася ультраструктурними порушеннями мозаїчного характеру у нейронах неокортексту. Зокрема, на відміну від інтактних тварин у щурів із гіперглікемією частина пірамідальних нейронів перебувала в стані апоптозу переважно за мітохондріальним типом (рис. 2). При чому у більшості нейронів спостерігалася значна дезорганізація елементів гранулярного ретикулуму та зменшення кількості цистерн і їх розмірів. Характерними також були набряк і утворення вакуолоподібних цистерн, а також виразний хроматоліз уражених нейронів. У деяких випадках відмічалася утворення структур із концентрично розміщеними мембранами. У збережених нейронах відзначалася значна проліферація елементів комплексу Гольджі за рахунок компонентів везикул. У нейронах з характерними явищами хроматолізу спостерігався набряк і вакуолізація цистерн пластинчастого апарату, часто з деформацією цистерн і їх фрагментацією. При приближенні – підвищена кількість лізосом, тілець мультивезикул і окремих осміофільних включень. У хроматолітично змінених нейронах відмічалася велика кількість набряклих світлих мітохондрій із зруйнованою структурою крист, а також ушкоджені мітохондрії велетенських розмірів. У складі аксоаксональних і аксосоматичних синапсів відмічалася різке зменшення кількості синаптичних пухирців, деструкція пресинаптичної мембрани і потовщення постсинаптичної мембрани на тлі

збільшення розмірів аксональних терміналів і довжини активної зони. Ушкодження астроглії представлені множинною деструкцією мембран, вираженим набряком перикапілярних відростків і дистрофією кінцевих ніжок та появою в них атипичних структур. Часто відростки астроцитів були різко розширені. Нерідко виявлялися некротично змінені астроцити, наближені до апоптично змінених фігур пірамідних нейронів (рис. 2).

Повторні впродовж 20 діб внутрішньошлункові введення пірацетаму в дозі 500 мг/кг сприяли зменшенню вмісту маркерів ОМБ у неокортексі, більшою мірою стосовно КФГ, рівень якого на 12,6 % ($p < 0,01$) був нижчим порівняно з групою активного контролю (рис. 1). За умов курсового введення пірацетаму (400 мг/кг) та метформіну (500 мг/кг) зниження вмісту АФГ та КФГ порівняно з групою активного контролю відмічалось на 35 % ($p < 0,01$) та 21,1 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 1). Водночас, дослідна комбінована терапія статистично переважала за своїми параметрами значення групи пірацетаму, як стосовно АФГ – зниження на 30,5 % ($p < 0,05$), так і КФГ – -9,6 % ($p < 0,05$) (рис. 1).

На відміну від метформіну піоглітазон (10 мг) при сумісному введенні з пірацетамом не чинив значущого впливу стосовно АФГ, однак сприяв помірному зменшенню на 10,8 % ($p < 0,05$) в неокортексі вмісту пізнього маркера ОМБ – КФГ. У цілому проведена зазначена експериментальна терапія за своїми значеннями не відрізнялася від групи тварин, що отримували пірацетам ($p < 0,05$) (рис. 1).

Повторне внутрішньошлункове введення тіоцетаму (пірацетам 400 мг/кг та тіотриазолін 100 мг/кг) також сприяло значущому зниженню рівнів маркерів ОМБ у неокортексі на 15,3 % ($p < 0,05$) – АФГ та на 15,7% ($p < 0,05$) – КФГ (рис. 1).

Водночас, введення пірацетаму (400 мг/кг) та ацетилсаліцилової кислоти (50 мг/кг) впродовж 20 діб сприяло зниженню рівнів АФГ на 21,2 % ($p < 0,05$), а КФГ – на 24,1 % ($p < 0,001$) порівняно з групою активного контролю (рис. 1). При цьому, подана комбінація лікарських засобів на 15,6 % ($p = 0,08$) та 13,1 ($p < 0,05$) зменшувала вміст АФГ і КФГ порівняно з групою тварин, що отримували пірацетам.

При визначенні рівнів нітритів та нітратів у корі головного мозку після 20-денного введення

щуром пірацетаму і з метформіном, тіотриазоліном та АСК встановлено, що усі дослідні комбінації зменшували вміст NO_x на 32,8 ($p < 0,01$), 29,7 ($p < 0,05$), 31,7 ($p < 0,05$) та 30,4 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 1).

При цьому статистично значуще зниження рівня глюкози крові порівняно з групою активного контролю спостерігалось лише при курсовому сумісному введенні пірацетаму з гіпоглікемічними засобами метформіном та піоглітазоном відповідно на 34,6 ($p < 0,05$) та 27,9 % ($p < 0,05$) (рис. 1). Водночас рівень глюкози у цих групах залишався статистично вищим порівняно з групою пасивного контролю.

Ультраструктурні зміни нейронів у групі тварин із гіперглікемією, які впродовж 20 діб отримували пірацетам і метформін (400/500 мг/кг) мали аналогічний для алоксанового діабету характер, проте виражені вони були в значно меншій мірою. Зокрема, істотно були обмежені ушкодження більшості органел і мітохондріального апарату. Також відсутні мегамітохондрії і некробіотичні зміни клітин (рис. 3). На цьому фоні відзначалось істотне зменшення кількості синаптичних пухирців на тлі помірної дестабілізації пресинаптичної мембрани та ущільнення постсинаптичної мембрани. Нейрофібрили у складі відростків нейронів мали збережену структуру. Водночас, апоптично або некротично змінені гліоцити не виявлені. Значно зменшені прояви набряку і деструкції перикапілярних відростків астроцитів, які деякою мірою були розширені.

За умов експериментальної терапії пірацетамом (400 мг/кг) та піоглітазоном (10 мг/кг) ультраструктура нейронів не відрізнялася від характеристик цих клітин у тварин активного контролю (алоксановий діабет), за винятком певного обмеження проявів апоптозу. Водночас у складі синапсів значно спостерігався зменшений вміст синаптичних пухирців та ушкодження мембран синапсів. Більш вагомими змінами зафіксовані стосовно макроглії. Зокрема, виявлені істотні порушення ультраструктури астроцитів з деструкцією мембран, виразним набряком перикапілярних відростків і дистрофією кінцевих ніжок та наявністю некротично змінених астроцитів (рис. 4). Відростки цих гліальних клітин переважно були помірно розширені.

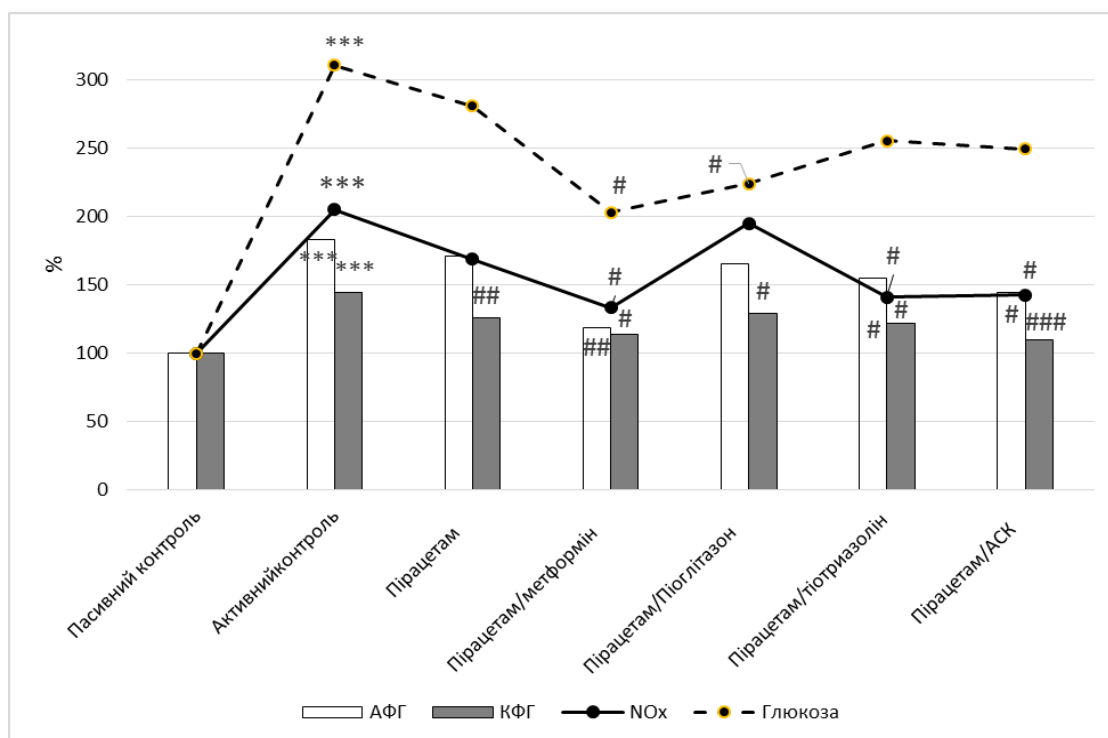


Рис. 1. Вміст продуктів окисної модифікації білків і стабільних метаболітів оксиду азоту в неокортексі, а також рівень глюкози крові за умов введення пірацетаму та його композицій шурам з алоксановою гіперглікемією *** – $p < 0,001$ стосовно показників, зафіксованих у групі пасивного контролю (інтактні тварини); # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ стосовно показників, зафіксованих у групі активного контролю

У групі тварин, які впродовж 20 діб отримували сумісно пірацетам 400 мг/кг та тіотриазолін 100 мг/кг (тіоцетам®), спектр ультраструктурних змін нейронів істотно не відрізнявся від групи активного контролю. Однак відмічено значне обмеження проявів ушкодження мітохондріального апарату, а також відсутність мегамітохондрій. Характерним також було виразне зменшення числа некротично змінених нейронів, а також поодинокі апоптично змінені нейрони. Стосовно макроглії у цій групі тварин порівняно з активним контролем не виявлені апоптично та некротично змінені гліоцити. Також значною мірою були обмежені прояви набряку та деструкції перикапілярних відростків астроцитів (рис. 5).

Ультраструктура нейронів, волокон та синапсів у неокортексі шурів з експериментально відтвореним цукровим діабетом, які отримували курсову експериментальну терапію пірацетамом (400 мг/кг) та АСК (50 мг/кг) в цілому не відрізнялася від групи тварин, яким у зівставних умовах вводили тіоцетам (рис. 6). Однак стосовно макроглії у цій групі відмічені істотні порушення ультраструктури астроцитів

неокортексу з деструкцією мембран, вираженим набряком перикапілярних відростків і дистрофією кінцевих ніжок. При цьому відростки астроцитів були помірно розширені. У деяких випадках поблизу мікросудин виявлялися некротично змінені астроцити. Отже, перебіг цукрового діабету у шурів супроводжується зростанням інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення білкових молекул, які свідчать про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму, а також зростання продукції оксиду азоту в неокортексі. Відомо, що гіперглікемія та активація поліолового шляху окиснення глюкози призводить до зростання інтенсивності реакцій вільнорадикального окиснення і подальшої декомпенсації системи антиоксидатного захисту [16]. Хоча АФК і чинять виражений ендотоксичний ефект, основу токсичної дії радикалів кисню становить конкурентна зв'язана реакція супероксидного аніон-радикала з оксидом азоту, результатом якої є утворення пероксинітриду: $NO + O_2^- = ONOO^-$ [16, 17]. Швидкість взаємодії NO з O_2^- у 3 рази вища, ніж NO із супероксиддисмутазою [16]. Пероксинітрид має набагато більшу реакційну активність, ніж

оксид азоту чи супероксид аніон. Водночас, це сприяє порушенням біодоступності молекули оксиду азоту як важливого нейротрансмітера. Адже NO, утворений нейронами, є медіатором, причому основна його роль полягає в синаптичній пластичності, регуляції церебрального кровотоку та встановленню міжнейронних синаптичних зв'язків під час розвитку нервової системи [18].

Неокортекс відіграє критичну роль у когнітивних функціях, які включають робочу пам'ять, увагу та поведінку [19]. Аналіз проведених досліджень дозволяє зробити висновок, що алоксановий діабет у щурів призводить до істотних ультраструктурних змін нейронального, гліального, а також синаптичного апарату, які лежать в основі деструкції нейронів і подальшої ініціалізації процесів апоптозу клітин у цьому мозковому утворенні. Причому активізація реакцій вільнорадикального окиснення білків та порушення обігу оксиду азоту за умов гіперглікемії можуть відігравати істотну роль у цих змінах, які призводять до дисфункції нейронів і розвитку когнітивних порушень.

Пірацетам при його сумісному використанні з метформіном, тіотриазоліном чи ацетилсаліциловою кислотою, однак не з піоглітазоном, значно знижує вміст ранніх і пізніх маркерів деструкції білкових молекул, а також вміст стабільних метаболітів оксиду азоту у неокортексі. Водночас використання усіх дослідних комбінацій лікарських засобів не здатне повною мірою забезпечити повне відновлення ультраструктурних змін у неокортексі. Однак комбіноване курсове введення пірацетаму сумісно з тіотриазоліном, ацетилсаліциловою кислотою та метформіном, однак не з піоглітазоном, істотно обмежує прояви деструктивних змін нейронів, синаптичного апарату у цьому утворенні. При цьому прояви церебропротективної активності не залежать від наявності гіпоглікемічних властивостей.

Отримані результати можуть свідчити про роль антиоксидантних властивостей зазначених комбінацій у їх церебропротективній активності.

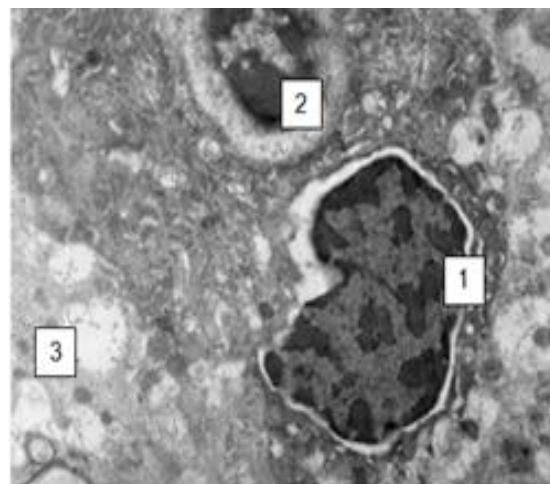


Рис. 2. Фронтальна кора щура з алоксановим діабетом. Апоптоз нейрона (1) та некроз астроцита (2). Набряк синаптичних терміналів (3). Електроннограма. $\times 8000$

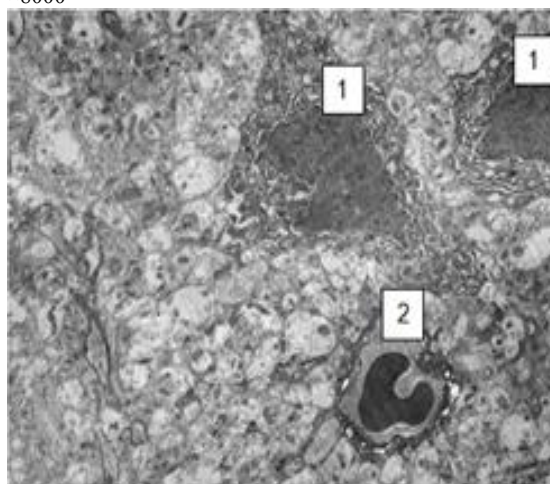


Рис. 3. Фронтальна кора щура з алоксановим діабетом. Пірацетам + метформін (400/500 мг/кг). Пірамідні нейрони з незначними порушеннями ультраструктури (1). Прекапілярна артеріола з ознаками обмеженого набряку стінки (2). Електроннограма. $\times 5000$

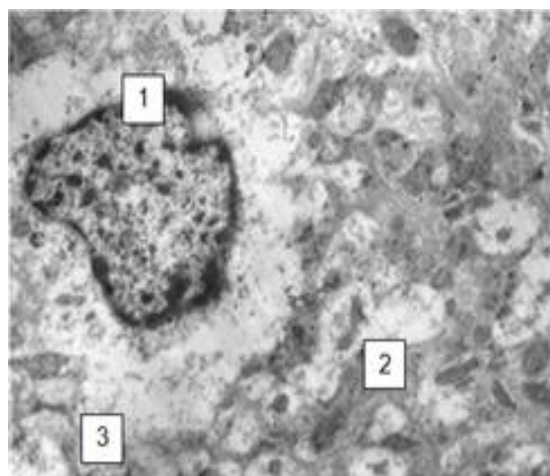


Рис. 4. Неокортекс щура з алоксановим діабетом. Пірацетам + піоглітазон (400/10 мг/кг). Некроз астроцита (1). Синаптичний апарат характеризується зниженням щільності синаптичних везикул та їх дисперсією (2). Дифузний набряк тканини (3). Електроннограма. $\times 8000$

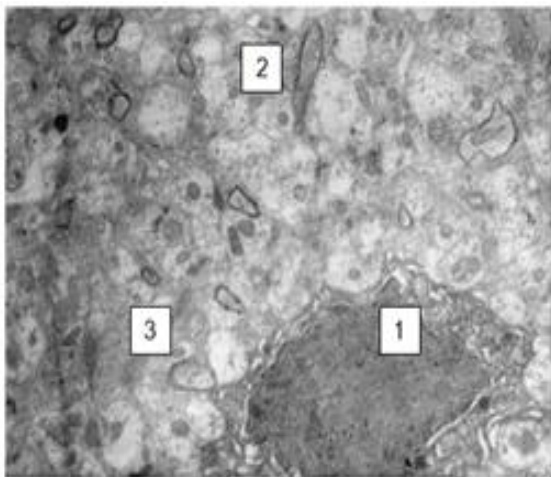


Рис. 5. Фронтальна кора щура з гіперглікемією. Тіоцетам (400/100 мг/кг). Ушкодження органел пірамідного нейрона (1). Порушення ультраструктури мієлінових нервових волокон (2). Структура мітохондрій збережена (3). Відсутні мегамітохондрії. Електроннограма. $\times 8000$

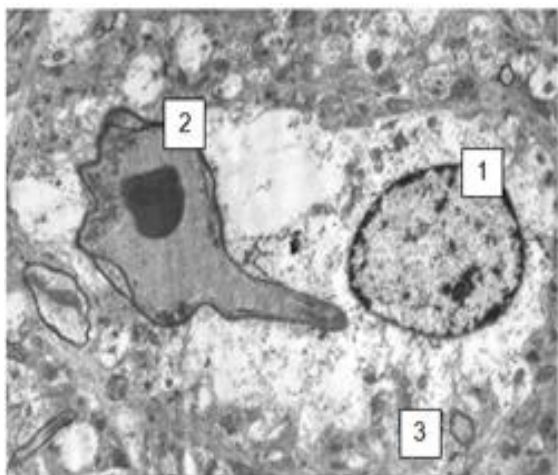


Рис. 6. Неокортекс щура з хронічною гіперглікемією. Пірацетам + АСК (400/50 мг/кг). Некробиотичні зміни астроцита (1) у безпосередній близькості до прекапілярної артеріоли (2). Порушення структури мієлінових нервових волокон (3). Електроннограма. $\times 5000$

Висновки

1. Експериментальне відтворення цукрового діабету у щурів супроводжується розвитком карбонільного стресу і приводить до порушень обігу оксиду азоту у неокортексі.
2. Пірацетам при його сумісному використанні з метформіном, тіотриазоліном чи ацетилсаліциловою кислотою знижує вміст раних і пізніх маркерів деструкції білкових молекул, а також рівень стабільних метаболітів оксиду азоту.
3. Комбіноване курсове введення пірацетаму сумісно з тіотриазоліном, ацетилсаліциловою кислотою та метформіном істотно обмежує прояви

деструктивних змін нейронів, синаптичного апарату та глії у неокортексі.

4. Сумісне використання піоглітазону з пірацетамом не сприяє зниженню проявів оксидативного та нітрозуючого стресу у неокортексі та не запобігає розвитку ультраструктурних змін у цьому мозковому утворенні.
5. Церебропротективні властивості дослідних комбінацій не залежать від наявності гіпоглікемічної активності.

References (список літератури)

1. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, et al. *Diabetic Neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. Diabetes Care.* 2005; 28(4):956–962.
2. Mironenko TV, Mironenko MO, Evtushenko VV. [Diabetic encephalopathy: clinical and diagnostic description, medical approaches]. *Ukrainian Neurological Journal.* 2011;3:101–108.
3. Pankiv VI. [Efficacy of Tiocetam medication for treatment diabetic patients with with diabetic encephalopathy]. *Mezhdunarodnyj Nevrologicheskyy Zhurnal.* 2007;4(14).
4. Markin SP. [Neurological manifestation of diabetes mellitus]. *Nevrologiia i Revmatologiya.* 2011;1.
5. Tomlinson DR, Gardiner NJ. *Glucose neurotoxicity. Nature Reviews Neuroscience.* 2008; 9(1):36–45.
6. Morozova OG. [Metabolic aspects of pathogenetic therapy for cerebral complications at diabetes mellitus]. *Liky Ukrainy.* 2011;2:50–57.
7. Liu Y, Tian X, Gou L, Sun L, Ling X, Yin X. *Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. Brain Res Bull.* 2013; 94:23–29.
8. Umegaki H, Hayashi T, Nomura H, Yanagawa M, Nonogaki Z, Nakshima H, Kuzuza M. *Cognitive dysfunction: an emerging concept of a new diabetic complication in the elderly. Geriatr Gerontol Int.* 2013;13(1):28–34.
9. Dave KR, Katyare SS. *Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat. J Endocrinol.* 2002;175(1):241–250.
10. Lenzen S. *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia.*

- 2008;51(2):216–226.
11. Belenichev IF, Pavlov SV. [Role of oxidative modification of proteins at cognitive disorders in rats after the influence of acute immobilization stress]. *Zaporozhskiy Medicinskiy Zhurnal*. 2005;3:125.
 12. Solodkov AP. *Fotometricheskij metod opredelenija nitratov i nitritov v biologicheskikh zhidkostjakh (instrukcija po primeneniju)*. [The photometric method to assess nitrates and nitrites in biological fluids (manual)]. *Vitebsk State Medical University Publ.*, 2001. 9 p.
 13. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. *Analytical Biochemistry*. 1982;126(1):131–138.
 14. Kamyshnikov VS. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovanijam i laboratornoj diagnostike* [Guidelines on clinical and biochemical research and laboratory diagnostics]. Moscow: MEDpress-inform, 2004. pp. 425–427.
 15. [Ethics of a doctor and human rights: statements on using animals for biomedical research]. *Eksperymentalna ta Klinichna Fiziologija i Biokhimiia*. 2003;2(22):108–109.
 16. Zanozina OV, Borovkov NN, Shherbatjuk TG. [Free-radical oxidation in diabetes type 2: formation sources and components of pathogenetic mechanisms of toxicity]. *STM*. 2010;3:104–112.
 17. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. *Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes*. *Eur J Pharmacol*. 2010;636(1–3):8–17.
 18. Sosunov AA. [Nitrogen oxide as a intracellular mediator]. *Sorosovskiy Obrazovatelnyi Zhurnal*. 2000;6(12):27–34.
 19. Luo F, Guo NN, Li SH, Tang H, Liu Y, Zhang Y. *Reduction of glutamate release probability and the number of releasable vesicles are required for suppression of glutamatergic transmission by β 1-adrenoceptors in the medial prefrontal cortex*. *Neuropharmacology*. 2014;83:89–98.
 20. Reynolds ES. *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy*. *J Cell Biol*. 1963;17:208–212.
 21. Sarkisov DS, Perova YuL. *Mikroskopicheskaia tehnika*. [Microscopic technique]. Moscow: Medicina Publ., 1996. 542 p.
 22. Uikli B. *Elektronnaia mikroskopiia dlia nachinaiushchih* [Electron microscopy for beginners]. Moscow: Mir Publ., 1975. 324 p.

(received 22.05.2014, published online 15.10.2014)

(отримано 22.05.2014, опубліковано 15.10.2014)

