



УДК 615.272:036.8.796.071:612.08

© 2012

Ю. М. Колесник, член-кореспондент НАН України І. С. Чекман,
І. Ю. Яковлева, І. Ф. Беленічев, А. В. Абрамов, Н. О. Горчакова

Порівняльний аналіз впливу таурину і пірацетаму на морфологічні зміни головного мозку щурів при циркуляторній гіпоксії

Експериментальними дослідженнями на щурах встановлено нейропротекторну дію таурину in vitro, а також in vivo порівняно з пірацетамом щодо морфологічних показників головного мозку щурів при циркуляторній гіпоксії.

Гостре порушення мозкового кровообігу призводить до розвитку гіпоксії-ішемії мозкової тканини, що супроводжується морфологічними та біохімічними, особливо біоенергетичними та пластичними, порушеннями. При гіпоксії відмічається мітохондріальна недостатність, порушення біохімічних процесів, що визначають структуру і склад нервової тканини, зокрема вміст нуклеїнових кислот, аденілових нуклеотидів, показників тіол-дисульфідної системи, гліколізу та біологічного окиснення [1]. У зв'язку з цим адекватним можна вважати призначення сполук як з антиоксидантною, так і з антигіпоксичною, адаптогенною і актопротекторною дією. Таурин, згідно з сучасними класифікаціями, належить до метаболічних, кардіо-, нейро-, гепатопротекторних лікарських засобів і має вищенаведені властивості [2–5]. Таурин поліпшує енергетичний обмін, АТФ-залежний зв'язок кальцію з сарколемою, за окремими даними виявляє протекторний ефект при гемічній та гістотоксичній гіпоксії [6, 7]. У той же час вірогідна нейропротекторна активність при моделюванні циркуляторної гіпоксії за допомогою гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) у щурів, зокрема з точки зору морфологічних змін у головному мозку, не встановлена [8]. Циркуляторна гіпоксія, поряд з гемічною, гістотоксичною та гіпоксичною, належить до загальноприйнятих моделей гіпоксії, яка дає можливість визначити не тільки антигіпоксичну, але також нейропротекторну активність, наявність якої допомагає реалізувати актопротекторну дію.

Мета дослідження — встановити нейропротекторну дію таурину щодо морфологічних показників у головному мозку щурів при циркуляторній гіпоксії порівняно з пірацетамом.

Матеріали і методи дослідження. Досліди проведені на 80 білих щурах обох статей стадного розведення лінії Вістар масою 180–220 г, які утримувалися на стандартному раціоні

віварію при природній зміні дня і ночі. Щурів поділили на чотири групи по 20 особин у кожній: I — інтактні тварини; II — тварини з ГПМК; III — тварини з ГПМК, яким вводили таурин; IV — тварини з ГПМК, яким вводили пірацетам. Модель циркуляторної гіпоксії відтворювали згідно з [9]. В експериментах на білих щурах викликали двобічну оклюзію загальних сонних артерій, що призводило до ГПМК, при якому спостерігається падіння мозкового кровообігу на 50–60% з поступовим відновленням до 85–90% вихідного рівня через 2–3 доби за рахунок компенсаторного включення колатерального кровообігу [10]. Досліджувані препарати щурам вводили внутрішньоочеревинно: таурин у дозі 100 мг/кг [11], пірацетам у дозі 500 мг/кг [1]. Евтаназію тварин проводили на 4-ту і 18-ту добу під легким ефірним наркозом.

Для визначення нейропротекторної активності таурину *in vitro* проводили виділення забарвлених фракцій нейронів і нейроглії з кори головного мозку в два етапи. На першому етапі мозкову тканину дезінтегрували з метою одержання клітинної суспензії, на другому — здійснювали диференційне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози та фіколу [12].

Для морфологічних досліджень наркотизованих тварин декапітували, виділяли мозок, 24 год фіксували його у фіксаторі Карнуа [13] і за стандартною схемою заливали в парафінові блоки, з яких готували серійні фронтальні 15-мікронні гістологічні зрізи в ділянці постцентральної звивини (сомато-сенсорна кора). Зрізи депарафінізували та забарвлювали галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсеном для специфічного виявлення РНК [13]. Показники визначали за допомогою морфологічних та денситометричних досліджень в ділянці IV–V шарів кори та CA1-зони кори гіпокампа [14]. Морфометричні дані отримували за допомогою мікроскопа Axioskop (Zeiss, Німеччина). Зображення нейронів, які одержували на мікроскопі із застосуванням високочутливої 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США), вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина).

Визначали такі показники: 1) щільність нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу кори мозку); 2) їх процентний склад; 3) площу тіл нейронів, гліальних клітин, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (мкм²); 4) вміст РНК у нейронах, гліальних клітинах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності (ООЩ)), який розраховували як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини; 5) індекс відношення кількості нейронів, що вижили, до апоптотичних і деструктивно змінених нейронів [14].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартного пакета аналізу програм статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excell 2003. Дані подано у вигляді вибіркового середнього значення \pm стандартна середня похибка середнього значення. Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента та *U*-критерію Уїтні–Манна комп'ютерної програми “STATISTICA for Windows 6.0”(StatSoft Inc., №AXXR712D833 214FAN5).

Результати дослідження та їх обговорення. Первинна оцінка нейропротекторної, антигіпоксичної дії таурину, проведена в дослідах *in vitro*, показана наявність антигіпоксичної дії при внесенні 500 мкМ препарату в суспензії нейронів (рис. 1). Вважаємо, що таурин не чинить прямої нейропротекторної дії, яка пов'язана з пригніченням глутаматної ексайтотоксичності — головної ланки нейродегенерації, а підвищує виживаність нейронів у дослідах *in vitro* за рахунок високих антиоксидантних властивостей тілової групи [12].

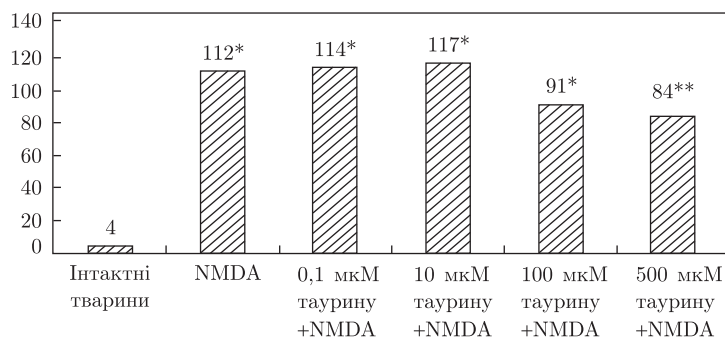


Рис. 1. Вплив таурину на кількість дегенеруючих нейронів у суспензії з додаванням 100 мкМ N-метил-D-аспартату(NMDA), $n = 15$.

* $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

Моделювання ГПМК у щурів призводило до вірогідного зменшення щільності нейронів у корі на 17% порівняно з інтактними тваринами (табл. 1). При цьому відмічалось вірогідне зменшення площі тіл нейронів на 16,04% зі зниженням у них вмісту РНК в 1,8 раза порівняно з інтактними тваринами. Крім того, спостерігалась тенденція до зменшення щільності гліальних клітин у корі головного мозку та вірогідне збільшення площі гліоцитів на 8,3 та 5,3% на 4-ту і 18-ту добу відповідно, що супроводжувалося зниженням вмісту РНК у цих клітинах у 3,18 та 3,21 раза на 4-ту та 18-ту добу відповідно (табл. 2). Це свідчить про пригнічення функціонального стану гліоцитів у відповідь на ішемічне пошкодження мозку.

Таблиця 1. Порівняльна оцінка впливу таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на щільність нейронів (кількість клітин/мм² площі зрізу) IV–V шарів кори головного мозку щурів з експериментальною ішемією, $n = 20$

Умови експерименту	Щільність нейронів, клітин/мм ²		Площа тіл нейронів, мм ²		Вміст РНК в нейронах, ООЩ	
	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба
Інтактні тварини	1281 ± 34	1292 ± 31	75,21 ± 1,12	74,87 ± 1,32	9,69 ± 0,15	9,72 ± 0,14
ГПМК	1065 ± 27*	1082 ± 19*	63,15 ± 0,9*	63,12 ± 0,8*	5,4 ± 0,2*	5,5 ± 0,6*
ГПМК + таурин	1067 ± 33*	1177 ± 17**	64,11 ± 0,5*	70,11 ± 0,7**	5,6 ± 0,11*	8,11 ± 0,17**
ГПМК + пірацетам	1060 ± 38*	1163 ± 26**	63,46 ± 0,8*	68,71 ± 0,9**	5,7 ± 0,18*	8,03 ± 0,23**

* $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P < 0,05$ порівняно з контролем ГПМК.

Таблиця 2. Порівняльна оцінка впливу таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на щільність нейроглії (кількість клітин/мм² площі зрізу) IV–V шарів кори головного мозку щурів з експериментальною ішемією, $n = 20$

Умови експерименту	Щільність гліальних клітин, клітин/мм ²		Площа тіл гліальних клітин, мм ²		Вміст РНК в гліальних клітинах, ООЩ	
	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба
Інтактні тварини	418 ± 21	421 ± 14	20,5 ± 0,19	20,7 ± 0,24	3,34 ± 0,07	3,31 ± 0,05
ГПМК	396 ± 11	410 ± 11	22,2 ± 0,11*	21,8 ± 0,17*	1,05 ± 0,02*	1,03 ± 0,02*
ГПМК + таурин	408 ± 11	433 ± 10	21,8 ± 0,12	22,0 ± 0,11	1,25 ± 0,04**	2,00 ± 0,02**
ГПМК + пірацетам	400 ± 19	435 ± 14	21,7 ± 0,28	22,3 ± 0,18	1,25 ± 0,02**	1,89 ± 0,03**

* $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P < 0,05$ порівняно з контролем ГПМК.

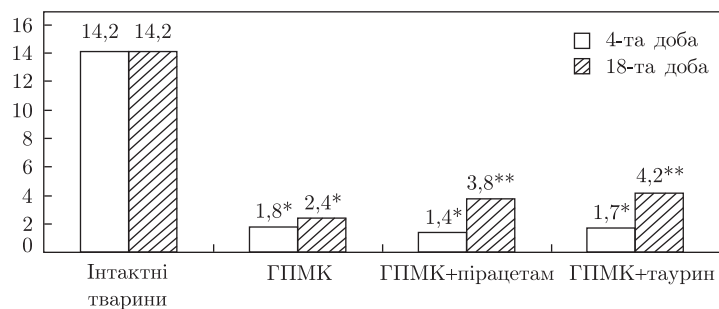


Рис. 2. Порівняльна оцінка впливу таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на відношення нейронів, що вижили, до числа загиблих у корі головного мозку щурів (поля IV–V) з експериментальною ішемією, $n = 20$.

* $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P \leq 0,05$ порівняно з контролем

У корі головного мозку щурів при моделюванні ГПМК вірогідно підвищувалася щільність апоптичних клітин у 17 разів, а також зростала частка апоптичних і деструктивно змінених клітин у 10 разів і 8,7 раза на 4-ту і 18-ту добу відповідно (табл. 3). Також моделювання ГПМК призводило до зниження відношення кількості нейронів, що вижили, до числа загиблих у 7,8 та 5,9 раза на 4-ту і 18-ту добу відповідно (рис. 2).

Експериментальна терапія тварин з ГПМК таурином і пірацетамом не впливала на щільність нейронів і гліоцитів у корі головного мозку в гострий період ішемії (на 4-ту добу). У віддалені терміни ішемії (на 18-ту добу), порівняно з групою щурів з ГПМК, таурин і пірацетам спричиняли вірогідне підвищення щільності нейронів на 8,8 і 7,5%, площі тіл нейронів на 11 і 8,8%, зростання вмісту РНК в нейронах у 1,47 і 1,46 раза відповідно (див. табл. 1), а також тенденцію до підвищення щільності гліальних клітин та площі тіл гліальних клітин у корі головного мозку щурів (див. табл. 2). За дії таурину і пірацетаму підвищувався вміст РНК у гліальних кітинах на 4-ту добу ГПМК на 19% та на 18-ту добу ГПМК в 1,9 та 1,83 раза відповідно (див. табл. 2). Обидва препарати виявляли протекторну дію щодо гліальних клітин, підвищували їх виживаність з 4-ї доби експерименту, з максимальним проявом ефекту у відновлювальний період церебральної ішемії. Отримані результати не суперечать даним інших дослідників, які встановили, що таурин є нейротрофічним засобом, регулює нейротрансмісію, активує гліоцитоз, сприяє активному метаболізму нейротрансмітерів [5].

Таблиця 3. Порівняльна оцінка впливу таурину (100 мг/кг) і пірацетаму (500 мг/кг) на щільність апоптичних і деструктивно змінених клітин IV–V шарів кори головного мозку щурів з експериментальною ішемією, $n = 20$

Умови експерименту	Щільність апоптичних клітин на 1 мм ²		Частка апоптичних і деструктивно змінених клітин, %	
	4-та доба	18-та доба	4-та доба	18-та доба
Інтактні тварини	23 ± 7	23 ± 1	2,8 ± 0,4	2,8 ± 0,4
ГПМК	394 ± 18*	387 ± 18*	28,45 ± 0,8*	24,36 ± 0,7*
ГПМК + таурин	371 ± 9*	268 ± 11**	21,7 ± 0,7**	17,8 ± 0,3**
ГПМК + пірацетам	418 ± 21*	293 ± 18**	26,3 ± 1,7*	19,4 ± 0,5**

* $P < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

** $P < 0,05$ порівняно з контролем ГПМК.

Таурин спричиняв зниження кількості деструктивно та апоптично змінених нейронів у корі мозку щурів на 18-ту добу ГПМК на 31%, не впливаючи на цей показник у гострий період патології (на 4-ту добу) (див. табл. 3). Кількість апоптичних і деструктивно змінених нейронів при введенні пірацетаму тваринам з ГПМК була вищою, ніж у групі контрольних тварин у гострий період ішемії (4-та доба), а у віддалений термін (18-та доба) препарат також вірогідно знижував відсоток апоптичних нейронів на 24,3%. Тобто таурин і пірацетам у гострий період мозкового інсульту (4-та доба) не мають нейропротекторної дії, тому що впливають виключно на анаеробне окиснення, здатні посилювати явища лактат-ацидозу і тим самим погіршують загальну картину ішемії мозку, яка підтверджується результатами біохімічних експериментальних і клінічних досліджень. Таурин вірогідно зменшував частку апоптичних і деструктивно змінених нейронів у головному мозку щурів з ГПМК на 23,7% у гострий період ішемії (4-та доба) і на 26,9% у відновний період (18-та доба). У відновний період (18-та доба) таурин і пірацетам вірогідно підвищували відношення кількості нейронів, що вижили, до числа загиблих у корі головного мозку щурів в 1,75 та 1,6 рази відповідно, що сприяло збільшенню загальної щільності клітин порівняно з контрольними значеннями і зниженню відсотка апоптичних нейронів (див. рис. 2).

Як у дослідженнях *in vitro*, так і *in vivo* встановлено, що таурин має певну нейропротекторну та цитопротекторну активність. Аналізуючи дані літератури та результати проведених досліджень, можна припустити, що таурин знижує нейродегенерацію за умов ініціювання глутаматної ексайтотоксичності за рахунок зв'язку цитотоксичних дериватів NO, гіперпродукція яких обумовлена активацією NMDA-рецепторів, відкриттям кальцієвих каналів і наступною активацією нейрональної NO-синтази [12].

На підставі результатів досліджень можна зробити висновок, що таурин і пірацетам мають нейропротекторну активність, більш виражену у відновний період ГПМК (на 18-ту добу). Нейропротекторна активність таурину стосовно відновлення (нормалізації) морфологічних показників у корі головного мозку щурів з ГПМК вища, ніж у пірацетаму, що може свідчити про більшу ефективність таурину при циркуляторній гіпоксії.

Таким чином, проведені дослідження показали, що у щурів з ГПМК у мозковій тканині на 18-ту добу експерименту знижується щільність нейронів, площа тіл нейронів, вміст РНК у нейронах і гліоцитах та відношення кількості нейронів, що вижили, до числа загиблих, підвищується щільність апоптичних клітин, а також частка апоптичних та деструктивно змінених клітин. У тварин, яким вводили таурин у дозі 100 мг/кг, на 18-ту добу відновлюється щільність, площа тіл нейронів, вміст РНК у нейронах і гліоцитах, підвищується відношення кількості нейронів, що вижили, до числа загиблих, а також зменшується щільність апоптичних клітин, частка апоптичних і деструктивно змінених клітин у корі головного мозку щурів. Таурин у дослідах *in vitro* при моделюванні ексайтотоксичності за допомогою 100 мкМ NMDA на суспензії нейронів головного мозку щурів має нейропротекторну дію при внесенні в середовище в концентрації 500 мкМ.

1. Беленичев И. Ф., Черный В. И., Колесник Ю. М. и др. Рациональная нейропротекция. – Донецк: ИД “Заславский”, 2009. – 262 с.
2. Вислобоков А. И., Игнатов Ю. Д., Галенко-Ярошевский П. А., Шабанов П. Д. Мембранотропное действие фармакологических средств. – Краснодар: Просвещение Юг, 2010. – 528 с.
3. Громова О. А., Торшин И. Ю., Гусев Е. И. и др. Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе церебрелизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот // Трудный пациент. – 2010. – № 2. – С. 25–31.
4. Чекман И. С., Горчакова Н. А., Французова С. Б., Нагорная Е. А. Метаболитные и метаболитотропные препараты в системе кардио- и органопротекции. – Киев, 2009. – 155 с.

5. *Wu J., Kohno T., Georgiev S. K. et al.* Taurine activates glycine and gamma-aminobutyric acid A receptors in rat substantia nigra neurons // *Neuroreport*. – 2008. – **19**, No 3. – P. 333–337.
6. *Маньковська І. М., Назаренко А. І., Носар В. І. та ін.* Нові шляхи патогенетичної корекції гемічної гіпоксії // *Физиол. журн.* – 1992. – **38**, № 2. – С. 43–47.
7. *Бабак В. В.* Фармакодинамика сочетанного применения сердечных гликозидов с цистеином, ацетилцистеином, таурином: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Киев, 1990. – 22 с.
8. *Кутняк В. П., Горчакова Н. О., Кава Т. В. та ін.* Вивчення ефективності мембранопротекторних засобів в умовах ішемічного та реперфузійного пошкодження мозку // *Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*. – 2008. – № 1. – С. 35–39.
9. *Чекман И. С., Губский Ю. И., Беленичев И. Ф. и др.* Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. рекомендации. – Киев, 2010. – 80 с.
10. *Tyson G. W., Teasdale G. M., Graham D. I., McCulloch J.* Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological changes // *Ann. Neurol.* – 1984. – **15**. – P. 559–567.
11. *Звягинцева Т. В., Киричек Л. Т., Кратенко А. С. и др.* Таурин: стресс-протекторное действие в эксперименте // *Эксперим. і клін. медицина*. – 2006. – № 3. – С. 33–36.
12. *Яковлева І. Ю., Беленічев І. Ф.* Мітопротекторний механізм нейропротекторної дії яктону в умовах експериментальної церебральної ішемії // *Вісн. проблем біології і медицини*. – 2010. – Вип. 2. – С. 147–150.
13. *Пирс Э.* Гистохимия. – Москва: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. – 962 с.
14. *Kolesnik Y. M., Abramov A. V.* Image analysis system for quantitative immunofluorescence measurement // *Microscopy and Analysis*. – 2002. – No 5. – P. 12–16.

Національний медичний університет

ім. О. О. Богомольця, Київ

Запорізький державний медичний університет

Надійшло до редакції 07.02.2012

Ю. М. Колесник, член-корреспондент НАН України **И. С. Чекман**,
И. Ю. Яковлева, **И. Ф. Беленичев**, **А. В. Абрамов**, **Н. А. Горчакова**

Сравнительный анализ влияния таурина и пирацетама на морфологические изменения головного мозга крыс при циркуляторной гипоксии

Експериментальними дослідженнями на крысах встановлено нейропротекторне діє таурина in vitro, а також in vivo в порівнянні з пирацетамом по відношенню до морфологічних показателів головного мозку крыс при циркуляторній гіпоксії.

Yu. M. Kolesnik, Corresponding Member of NAS of Ukraine **I. S. Chekman**,
I. Yu. Yakovleva, **I. F. Belenichev**, **A. V. Abramov**, **N. A. Gorchakova**

Comparative analysis of the influence of taurine and piracetam on the morphological changes in rats' brain with circulatory hypoxia

By the experimental investigations on rats, the neuroprotective action of taurine in vitro and in vivo comparatively with piracetam on morphological changes in brain during circulatory hypoxia is established.