



УДК 615.214.21.015.4:616.894-053.8

О. Г. Кметь

ВПЛИВ КАРБАЦЕТАМУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В ГИПОКАМПИ ЩУРІВ ІЗ ХВОРОБОЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

УДК 615.214.21.015.4:616.894-053.8

О. Г. Кметь

ВЛИЯНИЕ КАРБАЦЕТАМА НА ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В ГИПОКАМПЕ КРЫС С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет», Черновцы, Украина

Цель работы — изучить влияние карбацетама на систему оксида азота и антиоксидантную защиту в гиппокампе крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера. Исследования проводили на нелинейных лабораторных белых крысах-самцах массой 0,18–0,20 кг. Модель болезни Альцгеймера создавали внутрибрюшинным введением скополамина гидрохлорида. Карбацетам вводили внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг один раз в день, 14 дней. Определяли содержание стабильных метаболитов оксида азота, активность NO-синтазы, супероксиддисмутазы и каталазы в цитозольной фракции гиппокампа. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии карбацетама на системы оксида азота и антиоксидантной защиты при моделировании болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: карбацетам, скополамин-индуцированная болезнь Альцгеймера, система оксида азота, супероксиддисмутаза, каталаза.

UDC 615.214.21.015.4:616.894-053.8

O. G. Kmet

INFLUENCE OF CARBACETAM ON INDICATORS OF NITRIC OXIDE SYSTEM IN HIPPOCAMP OF RATS WITH ALZHEIMER'S DISEASE

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi, Ukraine

To study the effect of carbacetam on the system of nitric oxide and antioxidant protection in the hippocampus of rats with experimental Alzheimer's disease. Experiments were performed on non-linear laboratory white rats in males weighing 0.18–0.20 kg. The Alzheimer's disease model was created by intraabdominal administration of 27 days of scopolamine hydrochloride (Sigma, USA) at a dose of 1 mg/kg. From the 28th day of the experiment, carbacetam was administered intraperitoneally with a dose of 5 mg/kg in 1 ml of physiological saline — once a day, for 14 days. The content of stable metabolites of nitric oxide, NO-synthase, superoxide dismutase and catalase in the cytosolic fraction of the hippocampus was determined. Indicators of nitric oxide in Alzheimer's rats after 14 days of administration of carbacetam were characterized by a decrease in NO₂ content, NOS activity, an increase in catalase activity, and the normalization of superoxide dismutase. The obtained results indicate a corrective effect on the nitric oxide system and an increase of antioxidant protection under the action of carbacetam in the design of Alzheimer's disease.

Key words: carbacetam, scopolamine-induced Alzheimer's disease, nitric oxide system, superoxide dismutase, catalase.



Вступ

Зростання середньої тривалості життя супроводжується збільшенням кількості пацієнтів з хворобою Альцгеймера (ХА). За даними американських дослідників, до 2030 р. кількість людей похилого і старечого віку у всьому світі збільшиться до 1 млрд, порівняно з 420 млн у 2000 р. Сьогодні велика увага приділяється ролі оксиду азоту (NO) у патогенезі ХА. Установлено, що NO бере участь у формуванні нейрональної пам'яті, модулює процеси синаптичної передачі, впливає на функціональний стан глутаматних рецепторів, відіграє важливу роль у контролі мозкового кровотоку. Джерелом NO у центральній нервовій системі (ЦНС) є нейрони, нейрогліальні клітини (астроцити), клітини мікроглії та ендотелій кровоносних судин [1]. Завдяки відсутності заряду і малій величині молекули, NO здатний проникати крізь клітинні мембрани. Водночас надлишок NO, який синтезується в ендотеліальних клітинах, призводить до тяжких ушкоджень як самих мозкових судин, так і навколишніх нейронів [2]. Результатом є розвиток структурної патології мікросудин, яка досить часто спостерігається при ХА і призводить до дисфункції ендотелію і дизрегуляції NO в гіпокампі [3]. Даний процес спричинює судинне запалення й активацію гліальних клітин і астроцитів. У сукупності всі ці фактори, включаючи відкладення β -амілоїду [4], індукують зниження мозкового кровотоку та додаткову генерацію прозапальних стимулів, таких як активні форми кисню й азоту. Вищевказані зміни призводять до порушення вазодилатації та гіперперфузії мозку, зниження проникності

капілярів і погіршення видалення продуктів метаболізму, пригнічення обміну глюкози та кисню в мозку, прискорення розвитку нейродегенерації та прогресування ХА.

Між системою NO та вільнорадикальними процесами існує тісний взаємозв'язок. Активні форми кисню та продукти перекисного окиснення ліпідів викликають порушення проникності клітинних мембран, ушкоджують внутрішньоклітинні органели, змінюють метаболізм, що власне і лежить в основі ендогенної інтоксикації. Це, у свою чергу, супроводжується зростанням недостатності антиоксидантної системи. Для забезпечення клітинного вільнорадикального гомеостазу існують ферментативні та неферментативні системи генерації активних форм кисню й азоту і системи їхнього знешкодження. Розвиток патологічних станів, зокрема нейродегенерація, супроводжується порушенням цієї рівноваги й відбувається надлишкове генерування вільних радикалів на фоні дефіциту антиоксидантів [1].

Незважаючи на досить великий арсенал лікарських засобів, які застосовуються при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема ХА, пошук ефективних напрямів триває. У зв'язку з цим нас зацікавив модулятор ГАМК-ергічної системи, оригінальний похідний β -карболінів — карбацетам, синтезований в Інституті фізико-органічної хімії та вуглекислотної імені Л. М. Литвиненка НАН України під керівництвом доктора хімічних наук С. Л. Богзи. Ґрунтовними експериментальними дослідженнями встановлені позитивні впливи карбацетаму на окремі патогенетичні ланцюги когнітивних і мнестичних дисфункцій [5; 6],

за реалізацію яких відповідальним є гіпокамп [7].

Беручи до уваги роль NO в механізмах нейропротекції [8], у тому числі стану антиоксидантної системи, інтерес становить вплив карбацетаму на систему NO за наявності нейродегенеративних змін у ЦНС.

Мета роботи — вивчити вплив карбацетаму на систему оксиду азоту й антиоксидантного захисту в гіпокампі щурів із ХА.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проводилися на нелінійних білих щурах-самцях масою 0,18–0,20 кг, яких утримували за стандартних умов віварію при температурі 18–22 °C і відносній вологості 40–60 %, на збалансованому харчовому раціоні з вільним доступом до води. Дослідження виконувались із дотриманням Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Спочатку всіх щурів поділили на дві групи: 1-ша — контрольні (інтактні) щури; 2-га — щури з моделлю ХА. Беручи до уваги загальне визнання холінергічної гіпотези в патогенезі цього захворювання, дослідження проводили на щурах із скополамін-індукованою ХА [2]. Для створення моделі скополаміну гідрохлорид (Sigma, США) вводили внутрішньочеревинно (в/оч) дозою 1 мг/кг маси тіла у вигляді 0,01 % водного розчину (0,5 мл/100 г), один раз на добу протягом 27 днів. На 28-му добу групі щурів із ХА (3-тя група) розпочинали в/оч введення карбацетаму дозою 5 мг/кг маси тіла в 1 мл фізіологічного розчину. Обрана доза застосовувалась іншими науковцями для дослі-



дження ноотропних ефектів карбацетаму за інших експериментальних умов [6].

Щурам 1-ї та 2-ї груп аналогічним шляхом вводили еквівалентну кількість розчинника. Евтаназію тварин здійснювали під легким ефірним наркозом. На холоді виймали головний мозок, ретельно промивали охолодженим 0,9 % розчином NaCl і за стереотаксичним атласом виділяли гіпокамп, оскільки саме ця частина лімбічної системи головного мозку бере участь у механізмах формування емоцій та консолідації пам'яті [9]. Цитоплазматичну фракцію виділяли методом диференційного центрифугування гомогенату гіпокампа на рефрижераторній центрифугі при 1000 g 10 хв, потім 1400 g 10 хв при температурі 4 °С.

Вміст стабільних метаболітів монооксиду азоту (нітритів) NO₂ в гіпокампі визначали за методом Гріса [10]. Активність NO-синтази (NOS) [КФ 1.14.13.39] визначали спектрофотометричним методом [11]. Стан системи антиоксидантного захисту — за активністю супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] [12] та каталази [КФ 1.11.1.6] [13]. Кількість протеїну в пробі визначали за методом Лоурі.

Статистичний аналіз проводили за програмою Statistica 8.0, відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження, які наведені в табл. 1, показали зростання вмісту NO при моделюванні у щурів із ХА, на що вказує достовірне зростання його стабільного метаболіту — NO₂. Так, у групі з моделлю ХА даний показник зростав у 2,3 разу порівняно з групою контролю. У щурів, яким

14 днів вводили карбацетам, вміст NO₂ залишався вищим по відношенню до контролю в 1,7 разу, але був нижчим порівняно з ХА в 1,3 разу.

Враховуючи те, що біосинтез NO пов'язаний, у першу чергу, з активністю NOS, було проведено дослідження активності даного ензиму в гіпокампі. Установлено, що у щурів із ХА зростала активність NOS порівняно з контрольними тваринами в 2,1 разу. Водночас активність даного ензиму знижувалася в 1,4 разу після введення карбацетаму.

Слід відмітити поліфункціональність дії NO, яка зводиться не тільки до позитивних, але й негативних ефектів. У великих концентраціях NO може викликати токсичний вплив з утворенням сильного окисника, вільнорадикальної сполуки пероксинітриду, яка утворюється з супероксиду. Відповідно гіперпродукція NO є одним із ключових факторів у патофізіології окиснювального стресу, а пероксинітрид бере участь у реалізації даного процесу [8].

Пусковим ферментом антиоксидантної системи захисту

організму є СОД, яка перешкоджає утворенню пероксинітриду і відіграє важливу роль у внутрішньоклітинному захисті від активних форм кисню. Вона має найвищу каталітичну швидкість реакції, завдяки чому захищає клітину від ушкоджувальної дії супероксиду і в результаті метаболічних процесів перетворює його в пероксид водню. Він, у свою чергу, розщеплюється каталазою на молекулярний кисень і воду [7].

У нашому дослідженні виявлено зниження активності СОД у щурів з ХА на 25,6 % порівняно з контрольними тваринами. Проте при введенні карбацетаму відмічалася нормалізація активності СОД. Ще одним ензимом антиоксидантної системи є каталаза. У щурів із ХА активність даного ензиму знижувалася порівняно з групою контролю на 48,2 %. Проте у тварин, яким 14 днів вводили карбацетам, активність каталази зростала на 58,1 % порівняно з нелікованою групою. Отже, зростання активності СОД і каталази дозволяє зробити висновок про здатність карбацетаму активу-

Таблиця 1

Вплив карбацетаму на показники системи оксиду азоту та стан антиоксидантного захисту у цитозольній фракції гіпокампа щурів із скополамін-індукованою хворобою Альцгеймера, $M \pm m$, $n=7$

Показник	Контроль (інтактні щури)	Модель ХА	Модель ХА + карбацетам
NO ₂ , мкМ/г протеїну	2,241±0,090	5,091±0,227 $p < 0,001$	3,815±0,307 $p < 0,005$ $p_1 < 0,05$
Активність NOS, нМ NADPH/(хв·мг протеїну)	2,860±0,061	6,098±0,105 $p < 0,0001$	5,057±0,239 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Активність СОД, од/мг протеїну	0,312±0,010	0,232±0,021 $p < 0,05$	0,273±0,022
Активність каталази, мкмоль H ₂ O ₂ /(хв·мг протеїну)	140,977± ±12,723	73,026± ±12,337 $p < 0,05$	115,461± ±11,364 $p_1 < 0,05$

Примітка. p — достовірність порівняно з контролем; p_1 — достовірність порівняно з ХА.



вати систему антиоксидантного захисту гіпокампа щурів із ХА.

Оцінюючи отримані результати, слід зазначити, що лікувальне курсове введення щурів із ХА карбацетаму здатне перешкоджати розвитку нейродегенерації та прогресуванню ХА.

Висновки

1. Після введення протягом 14 днів карбацетаму дозою 5 мг/кг спостерігається зниження вмісту NO₂ й активності NOS у гіпокампі щурів із ХА, що вказує на коригувальний вплив препарату на систему оксиду азоту.

2. Зростання активності каталази та нормалізація СОД після введення карбацетаму при ХА у щурів свідчить про підвищення антиоксидантного захисту в гіпокампі.

Перспективи подальших досліджень. Обґрунтовано є перспектива дослідити вплив карбацетаму на стан глутатионової системи гіпокампа за умов експериментальної хвороби Альцгеймера.

Ключові слова: карбацетам, скополамін-індукована хвороба Альцгеймера, система оксиду азоту, супероксиддисмутаза, каталаза.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lipid Peroxidation, Nitric Oxide Metabolites, and Their Ratio in a Group of Subjects with Metabolic Syndrome / G. Caimi et al. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014. Article ID 824756, 8 p.

2. Michael De Silva T., Miller Alyson A. Cerebral Small Vessel Disease: Targeting Oxidative Stress as a Novel Therapeutic Strategy? *Front. Pharmacol.* 2016. Vol. 17 (7). P. 61.

3. Nayernia Z., Jaquet V., Krause K. H. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2014. Jun 10. Vol. 20 (17). P. 2815–2837.

4. Deposition of amyloid β in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage

pathways in cerebral amyloid angiopathy / A. Keable et al. *Biochim Biophys Acta*. 2016, May. Vol. 1862 (5). P. 1037–1046.

5. Ельський В. Н., Зяблицев С. В. Нейрогормональные регуляторные механизмы при черепно-мозговой травме. Донецк. Новый мир, 2008. 240 с.

6. Зяблицев С. В., Стародубська О. О., Богза С. Л. Вплив карбацетаму на когнітивні порушення при експериментальній черепно-мозковій травмі, можлива роль вазопресину. *Травма*. 2017. № 18 (2). С. 53–58.

7. Allocentric Spatial Memory Testing Predicts Conversion from Mild Cognitive Impairment to Dementia: An Initial Proof-of-Concept Study / R. A. Wood et al. *Frontiers in Neurology*. 2016. Vol. 7. P. 215.

8. Balez R., Ooi L. Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.

9. Fully automated atlas-based hippocampal volumetry for detection of Alzheimer's disease in a memory clinic setting / P. Suppa et al. *J Alzheimers Dis*. 2015. Vol. 44 (1). P. 183–193.

10. Чекман И. С., Губский Ю. И., Громов Л. А. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. рекомендации Государственного фармакологического центра МЗ Украины. Киев, 2010. 81 с.

11. Спосіб визначення активності NO-синтази в гомогенатах тканин: пат. 13132 Україна, МПК JOIN 33/48 / Колесник Ю. М., Беленічев І. Ф., Абрамов А. В., Павлов С. В. № 200509119; заявл. 27.09.2005.

12. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1983. № 10. С. 30–33.

13. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19.

REFERENCES

1. Caimi G., Lo Presti R., Montana M. et al. Lipid Peroxidation, Nitric Oxide Metabolites, and Their Ratio in a Group of Subjects with Metabolic Syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014. Article ID 824756, 8 p.

2. Michael De Silva T. and Miller Alyson A. Cerebral Small Vessel Disease: Targeting Oxidative Stress as a Novel Therapeutic Strategy? *Front. Pharmacol.* 2016; 17 (7): 61.

3. Nayernia Z., Jaquet V., Krause K.H. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2014. Jun 10; 20 (17): 2815–37.

4. Keable A., Fenna K., Yuen Ho M. at al. Deposition of amyloid β in the walls of human leptomeningeal arteries in relation to perivascular drainage pathways in cerebral amyloid angiopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2016, May; 1862 (5): 1037–1046.

5. El's'kiy V.N., Zyablitsev S.V. Neurohormonal regulatory mechanisms for craniocerebral trauma. Donetsk, Novyy mir, 2008. 240 p.

6. Zyablitsev S.V., Starodubs'ka O.O., Bogza S.L. Influence of carbocetam on cognitive derangements at experimental craniocerebral trauma, a positive role of vasopressin. *Травма*. 2017; 18 (2): 53–58.

7. Wood R.A., Moodley K.K., Lever C. at al. Allocentric Spatial Memory Testing Predicts Conversion from Mild Cognitive Impairment to Dementia: An Initial Proof-of-Concept Study. *Frontiers in Neurology*. 2016. 7: 215.

8. Balez R. and Ooi L. Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.

9. Suppa P., Anker U., Spies L. et al. Fully automated atlas-based hippocampal volumetry for detection of Alzheimer's disease in a memory clinic setting. *J Alzheimers Dis*. 2015; 44 (1): 183–93.

10. Chekman I.S., Gubskiy Yu.I., Gromov L.A. Preclinical study of the specific activity of potential neuroprotective drugs. Methodical recommendations of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine. Kiev, 2010. 81 p.

11. Patent 13132 Ukrayna, МПК JOIN 33/48. Sposib viznachennya activity NO-synthase in tissue homogenates. Kolesnik Yu.M., Belenichev I.F., Abramov A.V., Pavlov S.V. № 200509119; zavavl. 27.09.2005.

12. Dubinina E.E., Sal'nikova L.A., Efimova L.F. Activity and isoenzymatic spectrum of superoxide dismutase of erythrocytes and human blood plasma. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1983; 10: 30–33.

13. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16–19.

Надійшла до редакції 27.08.2018

Рецензент д-р мед. наук,
проф. П. С. Вастьянов,
дата рецензії 05.09.2018

