

В. І. Жилюк

Вплив гіпоглікемічних, антиоксидантних та антиагрегантних засобів на антиамнестичні властивості пірацетаму за умов алоксанового діабету в щурів

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: ноотропи, гіпоглікемічні засоби, антиоксиданти, антиагреганти, когнітивний дефіцит, алоксановий діабет

Цукровий діабет – група метаболічних розладів, що характеризуються гіперглікемією, яка виникає внаслідок дефектів у секреції інсуліну, або в його дії, або в наявності обох цих факторів. Крім цього, доволі часто перебіг діабету асоційований з іншими метаболічними порушеннями, такими як ожиріння, інсулінорезистентність, дисліпідемія та підвищений кров'яний тиск [1].

Відомо, що цукровий діабет може викликати дисфункцію центральної нервової системи, яка визначається терміном «діабетична енцефалопатія» і може вносити свій додатковий вклад у соціальне значення цієї хвороби. Встановлено, що прискорене зниження пізнавальних функцій у хворих на тип 2 цукрового діабету асоційоване з прогресуючими змінами мозкової тканини при магнітно-резонансному дослідженні, яке характеризувалося як судинним ушкодженням, так і глобальною атрофією [2]. При цьому вивчення судинних і метаболічних чинників ризику не виявило ніяких специфічних детермінантів прискореного зниження когнітивних функцій [2, 3]. Слід зазначити, що використання засобів специфічної терапії не захищає від розвитку діабет-асоційованого когнітивного дефіциту, що підтверджено як клінічними, так і експериментальними дослідженнями [4, 5]. Саме це обґрунтовує необхідність термінової розробки та впровадження нових стратегій для попередження і лікування даних ускладнень цієї ендокринної патології. Сьогодні в комплекс-

сному лікуванні діабету, з метою лікування та попередження ускладнень, крім гіпоглікемічних препаратів, використовується досить потужний арсенал лікарських засобів і зокрема – антиоксиданти та антиагреганти. Однак у літературі недостатньо висвітлені відомості про вплив цих засобів, а також і препаратів специфічної гіпоглікемічної терапії на прояви когнітивного дефіциту, а також антиамнестичні властивості ноотропів за умов цукрового діабету.

Мета дослідження – з'ясування впливу метформіну, піоглітазону, тіотриазоліну та ацетилсаліцилової кислоти на антиамнестичні властивості пірацетаму у щурів з алоксановим діабетом.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на 80 білих щурах-самцях масою 250–300 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію (температура повітря: 22 ± 2 °C, світло/темрява: 12/12 год).

Експериментальну модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразового підшкірного введення алоксану моногідрату (Sigma, США) у дозі 150 мг/кг у вигляді 5 % розчину в цитратному буфері, рН 4,5 після попередньої 24-год депривації їжі (при вільному доступі до води) [6, 7]. Для зменшення загибелі тварин унаслідок гіпоглікемічного шоку після введення алоксану, щури протягом 24 год після індукції діабету замість води отримували 5 % розчин глюкози.

Рівень глюкози крові визначали на 11 добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для подальших досліджень залучали тільки тварин з підвищеним рівнем глюкози (> 11 ммоль/л) [6, 7].

Перед початком уведення лікарських засобів тварини з гіперглікемією були розподілені на групи по 10 тварин: I – інтактні; II – інтактні (пасивний контроль) + скополамін; III – тварини з алоксановим діабетом (АД, активний контроль) + скополамін; IV – АД + пірацетам у дозі 400 мг/кг + скополамін; V – АД + пірацетам (400 мг/кг) + метформін (500 мг/кг) + скополамін; VI – АД + пірацетам (400 мг/кг) + піоглітазон (10мг/кг) + скополамін; VII – АД + тіоцетам (400/100 мг/кг) + скополамін; VIII – АД + пірацетам (400 мг/кг) + ацетилсаліцилова кислота (50 мг/кг) + скополамін.

В експерименті використані наступні 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 згідно з протоколом дослідження вводили 1 раз на добу протягом 20 діб, починаючи з 11 дня після введення алоксану, встановлення рівня гіперглікемії та розподілу на групи. Інтактним тваринам (n = 20) та тваринам активного контролю (n = 10) у відповідному режимі внутрішньошлунково (в/ш) вводили дистильовану воду.

Оцінку впливу досліджуваних засобів на процеси навчання та збереження пам'ятного сліду проводили за допомогою умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) у модифікації [8]. На 5-й день від початку введення дослідних препаратів виробляли УРПУ. Для цього тварину розміщували в світлому відсіку. Після заходу щура в темний відсік, дверцята закривали і тварині через електрифіковану підлогу наносили 5 ударів струмом силою 1 мА з інтервалом 5 с та тривалістю кожного імпульсу – 1 с. За 30 хв до навчання тваринам, з метою формування амнезії навички, внутрішньочеревинно вводили 0,05 % розчин скополаміну гідроброміду (Sigma, США) у дозі 0,8 мг/кг [9]. Реєстрували латентний період заходу в темний відсік (ЛПІ). Оцінку впливу

препаратів на процеси вводу та збереження інформації проводили на 6-ту (ЛП2) та 20-ту (ЛП3) добу відповідно, а також враховували кількість тварин з амнезією навички.

Для оцінки ефективності відтворення навички УРПУ враховували коефіцієнт антиамнестичної активності препаратів ($K_{Аа}$) за наступною формулою [8]:

$$K_{Аа} = \frac{\Delta ЛП_{\text{препарат}} - \Delta ЛП_{\text{діабет}}}{\Delta ЛП_{\text{інтактні}} - \Delta ЛП_{\text{діабет}}} \cdot 100 \%,$$

де $\Delta ЛП$ = ЛПтестування – ЛПвироблення рефлексу

Усі дослідження були проведені при кімнатному освітленні в часовому інтервалі від 12 до 17 години.

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 включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їхніх похибок ($\pm m$), вірогідність різниці середніх арифметичних (P) за допомогою непараметричного – U-критерію Манна-Уїтні. Для дослідження рівня антиамнестичної активності використаний точний критерій Фішера.

Усі експериментальні процедури здійснювали згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідках» [10].

Результати та їх обговорення. Результати отриманих досліджень свідчать, що латентний період заходу тварин у темний відсік на 5 добу після введення досліджуваних препаратів суттєво не відрізнявся в усіх дослідних групах (табл. 1). Це вказує на гомогенність груп та відсутність впливу алоксанового діабету, на природну прихильність щурів до темного простору.

Однак при тестуванні тварин через 24 год та на 20 добу після навчання за умов попереднього введення скополаміну спостерігалися певні відмінності даного показника в контрольній та дослідній групах (табл. 1). Встановлено, що введення скополаміну інтакт-

Латентний період навички УРПУ за умов скополамінової амнезії у щурів з алоксановим діабетом при застосуванні пірацетаму та його комбінацій з гіпоглікемічними, антиоксидантними та антиагрегантними засобами, $M \pm m$ ($n = 10$)

Група	Умови експерименту	Латентний період, с		
		5 доба	6 доба	20 доба
1	Інтактні щури	22,70 ± 4,65	173,50 ± 6,50 ^{°°}	165,30 ± 14,70 [°]
2	Інтактні щури + скополамін	23,90 ± 3,65	97,10 ± 18,36	86,50 ± 22,96*
3	АД + скополамін	20,80 ± 1,99	42,70 ± 10,75	33,30 ± 9,39
4	АД + скополамін + пірацетам	19,30 ± 3,99	104,00 ± 25,67	85,30 ± 26,09
5	АД + скополамін + пірацетам+метформін	18,10 ± 3,15	146,80 ± 22,13**	164,50 ± 15,50****
6	АД + скополамін + пірацетам+піоглітазон	19,90 ± 2,37	82,50 ± 23,49	54,40 ± 22,01
7	АД + скополамін + тіоцетам	15,20 ± 2,27	116,40 ± 26,06	147,10 ± 18,48**
8	АД + скополамін + пірацетам+АСК	22,10 ± 2,50	156,50 ± 17,19***	161,70 ± 15,17****

Примітка. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; відносно групи тварин з алоксановим діабетом;

[°] $P < 0,05$; ^{°°} $P < 0,01$ – відносно показників у групі інтактних тварин із скополамін-індукованою амнезією; # $P < 0,05$ – відносно показників у групі тварин, що отримували пірацетам.

ним тваринам призводить до зменшення тривалості латентного періоду на 6 та 20 добу дослідження, яка на 44 % ($P < 0,01$) та 47,7 % ($P < 0,05$) поступалася за значеннями показника групи щурів, які не піддавалися впливу скополаміну.

Водночас у групі тварин з експериментальним діабетом використання скополаміну поглиблювало прояви когнітивного дефіциту, що вказує на значення хронічної гіперглікемії як додаткового чинника, здатного поглиблювати вплив амнезуючого фактора – скополаміну. Показники ЛП2 на 56 % ($P = 0,064$) були нижчими порівняно з пасивним контролем. Тестування тривалості пам'ятного сліду на 20 добу від введення препаратів у тварин активного контролю вказувало на подальше згасання рефлексу порівняно з 6 добою дослідження в цій групі. Свідченням цього було зменшення ЛП3 на 61,5 % ($P < 0,05$) відносно відповідного значення в групі інтактних тварин (табл. 1).

Необхідно зазначити, що курсове застосування пірацетаму та його комбі-

націй з цукровознижуючими, антиоксидантними чи антиагрегантними засобами чинило різний вплив на процеси навчання та збереження виробленої навички.

Так попереднє внутрішньошлункове застосування цього ноотропного препарату тваринам з тривалою гіперглікемією сприяло помірному зростанню латентного періоду на 6 та 20 добу спостереження в 1,43 та 1,56 рази порівняно з групою активного контролю, однак вказані зміни не носили значимого характеру (табл. 1).

Сумісне використання пірацетаму з метформіном справляло суттєвий позитивний вплив на процеси засвоєння та збереження умовної навички. Так, дія цієї комбінації фармакологічних засобів за умов впливу амнезуючого чинника та гіперглікемії характеризувалася зростанням ЛП2 та ЛП3 в 3,44 ($P < 0,01$) та 4,94 ($P < 0,001$) рази порівняно з групою активного контролю. Характерно, що значення, отримані в цій групі, суттєво перевищували показники групи пірацетаму. Сумісне з пірацетамом використання іншого гіпогліке-

мічного засобу – піоглітазону не чинило суттєвого впливу на когнітивну дисфункцію, викликану м-холіноблокатором та гіперглікемією. Активність такої комбінації поступалася монотерапії пірацетамом (табл. 1).

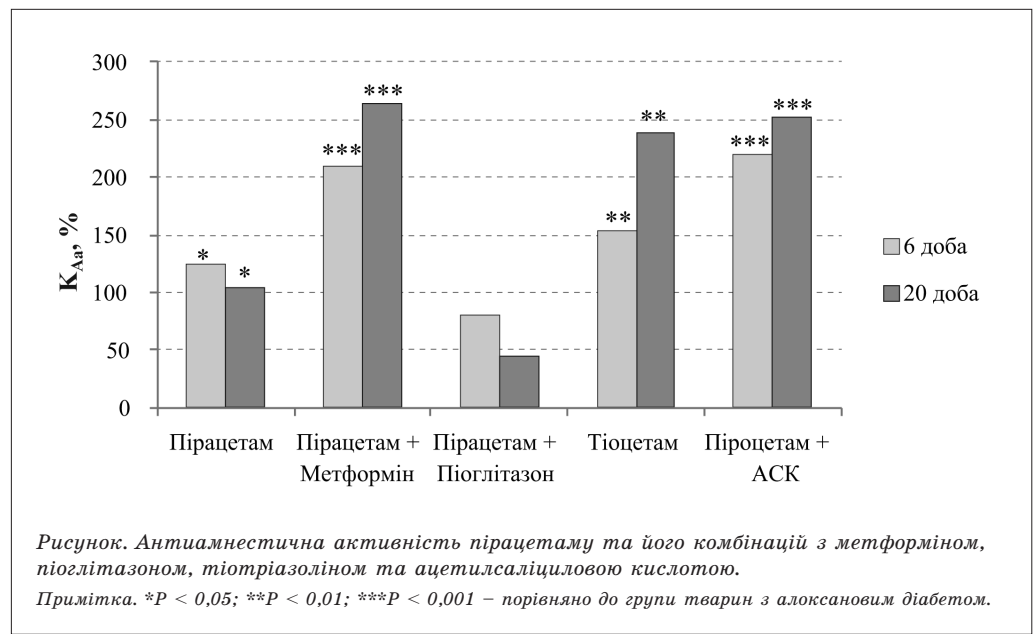
При сумісному застосуванні пірацетаму з антиоксидантом тіотриазоліном (Тіоцетам®) характерною була відсутність значимого впливу на амнестичний ефект скополаміну на етапі введення інформації. Отримані значення в цієї категорії тварин вірогідно не відрізнялися від показників групи пірацетаму та активного контролю (табл. 1). Однак слід зазначити, подальша експериментальна терапія тіоцетамом сприяла поступовому відновленню втраченої навички, що характеризувалося збільшенням латентного періоду в 4,41 разу ($P < 0,01$) порівняно з групою алоксан-діабетних тварин та на 75 % ($P = 0,1$) – з групою пірацетаму.

Пірацетам за умов гіперглікемії та одночасного застосування з антиагрегантними дозами ацетилсаліцилової кислоти виявляв значний ноотропний потенціал. Така комбінація препаратів знижувала амнестичний ефект скополаміну в щурів з хронічною гіперглікемією, що проявлялося суттєвим збільшенням латентного періоду в 3,66 разу ($P < 0,01$) через 24 год після навчання та – в 4,85 разу на 20 добу спостережен-

ня порівняно з тваринами активного контролю. При цьому на зазначених етапах дослідження вказана композиція значимо перевищувала за своїм антиамнестичним потенціалом активність пірацетаму в еквівалентній дозі (табл. 1).

Встановлено, що отримані дані чітко корелювали з показниками коефіцієнта антиамнестичної активності (K_{Aa}) пірацетаму та його комбінацій з іншими засобами (рисунок). Слід відмітити, що наявна висока антиамнестична активність комбінацій пірацетаму з метформіном, тіотриазоліном та АСК характеризувалася тенденцією до поступового зростання. Іншим важливим критерієм ноотропних властивостей дослідних композицій був відсоток тварин з втраченою умовною навичкою. Відповідно до отриманих значень дослідні композиції розмістилися наступним чином: пірацетам + метформін \geq пірацетам + АСК $>$ пірацетам + тіотриазолін $>$ пірацетам $>$ пірацетам+піоглітазон (табл. 2).

Таким чином, хронічна гіперглікемія у щурів посилює амнестичний потенціал скополаміну. У свою чергу, використання пірацетаму не здатне повною мірою попереджувати розвиток когнітивного дефіциту. При цьому проведення комбінованої терапії спроможне змінювати антиамнестичні властивості пірацетаму. Так використання пірацетаму в поєднанні з метформіном, на від-



Амнезія навички УРПУ за умов алоксанового діабету та використання пірацетаму і його комбінацій з гіпоглікемічними, антиоксидантними та антиагрегантними засобами

№	Умови експерименту	Термін спостереження, доба	% тварин, що залишилися у стартовому відсіку
1	Інтактні щури (n = 10)	6	90 ^{°°°}
		20	90 [°]
2	Інтактні щури + скополамін (n = 10)	6	20
		20	40*
3	АД + скополамін (n = 10)	6	0
		20	0
4	АД + скополамін + пірацетам (n=10)	6	50*
		20	40*
5	АД + скополамін + пірацетам + метформін (n = 10)	6	80 ^{***}
		20	90 ^{***}
6	АД + скополамін + пірацетам + піоглітазон (n = 10)	6	30
		20	20
7	АД + скополамін + тіоцетам (n = 10)	6	60 ^{**}
		20	70 ^{**}
8	АД + скополамін + пірацетам+АСК (n = 10)	6	80 ^{***}
		20	80 ^{***}

*Примітка.*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 – антиамнестичний потенціал відносно групи тварин з алоксановим діабетом; °P < 0,05; °°P < 0,01; °°°P < 0,001 – відносно показників у групі інтактних щурів зі скополамін-індукованою амнезією.*

міну від його застосування з іншим цукрознижуючим препаратом – піоглітазоном, сприяє відновленню втрачених когнітивних функцій. Слід зазначити, що у світовій літературі достатньо даних щодо наявності нейропротекторних властивостей піоглітазону при різних патологічних станах ЦНС, а також здатності попереджувати розвиток когнітивних розладів, у тому числі й при діабеті, що підтверджується численними дослідженнями [11–14]. Виявлені нами розбіжності, що вказують на відсутність значного ноотропного потенціалу піоглітазону за умов його одночасного застосування з пірацетамом, можуть бути пов'язані з фармакодинамічною взаємодією та потребують подальшого вивчення. У свою чергу, тіотриазолін та АСК при одночасному застосуванні з пірацетамом сприяють значимому зменшенню проявів когнітивного дефіциту в щурів з алоксановим діабетом, що вказує на доцільність використання антиокси-

дантних та антиагрегантних засобів сумісно з ноотропами для попередження або лікування когнітивних порушень, які виникають унаслідок діабету.

Висновки

1. Тривала гіперглікемія посилює амнестичні властивості скополаміну гідроброміду в щурів з алоксановим діабетом.
2. Комбіноване застосування пірацетаму з ацетилсаліциловою кислотою, тіотриазоліном або гіпоглікемічним засобом метформіном, але не піоглітазоном, проявляє значний антиамнестичний потенціал, який за своїми значеннями значно перевищує активність монотерапії пірацетамом.
3. Сумісне застосування пірацетаму з метформіном або ацетилсаліциловою кислотою є перспективним напрямом подальших досліджень з метою створення єдиної лікарської форми.

1. Protective effect of withania somnifera against oxidative stress and pancreatic β -cell damage in type 2 diabetic rats / T. Anwer, M. Sharma, K. K. Pillay, G. Khan // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* – 2012. – V. 69, № 6. – P. 1095–1101.
2. Accelerated cognitive decline in patients with type 2 diabetes: MRI correlates and risk factors / Y. D. Reijmer, E. van den Berg, J. de Bresser [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2011. – V. 27, № 2. – P. 195–202.
3. Wilson V. Cognitive impairment in patients with diabetes / V. Wilson // *Nurs. Stand.* – 2012. – V. 27, № 15–17. – P. 44–49.
4. Luteolin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats / Y. Liu, X. Tian, L. Gou [et al.] // *Brain Res. Bull.* – 2013. – № 94. – P. 23–29.
5. Cognitive dysfunction: an emerging concept of a new diabetic complication in the elderly // H. Umegaki, T. Hayashi, H. Nomura // *Geriatr. Gerontol. Int.* – 2013. – V. 13, № 1. – P. 28–34.
6. Dave K. R. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat / K. R. Dave, S. S. Katyare // *Journal of Endocrinology.* – 2002. – V. 175, № 1. – P. 241–250.
7. Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory receptors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat / M. Garcia, A. Moran, E. Calama [et al.] // *British Journal of Pharmacology.* – 2005. – V. 145, № 5. – P. 593–601.
8. Радионова К. С. Оригинальный ноотропный препарат «Ноопепт» устраняет дефицит памяти, вызванный блокадой М- и Н-холинорецепторов у крыс / Радионова К. С., Бельник А. П., Островская Р. У. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* – 2008. – Т. 146, № 7. – С. 65–68.
9. Elrod K. An evaluation of the mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols / K. Elrod, J. J. Buccafusco // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1988. – V. 29, № 1. – P. 15–21.
10. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
11. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents / K. Tureyen, R. Kapadia, K. K. Bowen [et al.] // *J. Neurochem.* – 2007. – V. 101, № 1. – P. 41–56.
12. Neuroprotective effect of pioglitazone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischemia in mice // B. Medhi, R. Aggarwal, A. Chakrabarti // *Indian. J. Exp. Biol.* – 2010. – V. 48, № 8. – P. 793–799.
13. Involvement of NMDA receptors in the beneficial effects of pioglitazone on scopolamine-induced memory impairment in mice / M. Almasi-Nasrabadi, M. Javadi-Paydar, S. Mahdavian [et al.] // *Behav. Brain. Res.* – 2012. – V. 231, № 1. – P. 138–145.
14. PPAR γ agonist pioglitazone reverses memory impairment and biochemical changes in a mouse model of type 2 diabetes mellitus // L. Y. Jiang, S. S. Tang, X. Y. Wang [et al.] // *CNS Neurosci. Ther.* – 2012. – V. 18, № 8. – P. 659–666.

В. И. Жилюк

Влияние гипогликемических, антиоксидантных и антиагрегантных средств на антиамнестические свойства пирацетама в условиях аллоксанового диабета у крыс

В исследованиях на лабораторных белых крысах установлено, что длительная гипергликемия потенцирует амнестические свойства скополамина гидробромида. В данных условиях опыта пирацетам при совместном применении с ацетилсалициловой кислотой (АСК), тиотриазолином (Тиоцетам®) или гипогликемическим средством метформином, но не пиоглитазоном, проявляет значительный антиамнестический потенциал, который по своим проявлениям значительно превышает таковой при монотерапии пирацетамом. Комбинированное применение пирацетама с метформином или ацетилсалициловой кислотой является перспективным направлением дальнейших исследований с целью создания единой лекарственной формы.

Ключевые слова: ноотропы, гипогликемические средства, антиоксиданты, антиагреганты, когнитивный дефицит, аллоксановый диабет

V. I. Zhylyuk

EffectS of hypoglycemic, antioxidant and antiplatelet drugs on antiamnestic properties of piracetam in rats with alloxan diabetes

It has been established that prolonged hyperglycemia potentiates the amnesic properties of scopolamine hydrobromide in rats with alloxan diabetes. In these experimental conditions piracetam when combined with acetylsalicylic acid (ASA), thiotriazolin (Tiocetam®) or hypoglycemic drug metformin, but not pioglitazone, shows significant antiamnestic potential which is much higher than as compared to the activity of piracetam alone. Combined use of piracetam with metformin or acetylsalicylic acid is a promising direction of further researches in order to create a single dosage form.

Key words: nootropic drugs, hypoglycemic drugs, antioxidants, antiplatelet agents, cognitive deficit, alloxan diabetes

Надійшла: 22.04.2013 р.

Контактна особа: Жилюк Володимир Іванович, кандидат медичних наук, доцент, кафедра фармакології, клінічної фармакології та фармакоекономіки, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», б. 9, вул. Дзержинського, м. Дніпропетровськ, 49044, Тел.: + 38 0 56 713 55 53. Електронна пошта: zhylyuk@ua.fm