

УДК [615.224:616.12-008:616.831-005]:57.084.1

І.А. ЗУПАНЕЦЬ, д. мед. н., професор; С.К. ШЕБЕКО, к. мед. н., доцент; І.А. ОТРИШКО, к. мед. н., доцент
/Національний фармацевтичний університет, Харків/

Експериментальна оцінка впливу препарату Капікор на процеси апоптозу в тканинах головного мозку щурів з церебральною ішемією

Резюме

Апоптоз – морфологічний прояв запрограмованої загибелі нейронів, асоціюється, в першу чергу, з нормальним функціонуванням центральної нервової системи. Однак при ряді патологічних станів, в тому числі при церебральній ішемії, рівень апоптозу істотно зростає. Метою даного дослідження стало вивчення механізмів церебропротекторної дії препарату Капікор – дослідження процесів апоптозу в ішемізованих тканинах головного мозку тварин на фоні розвитку гострого порушення мозкового кровообігу.

За результатами гістоморфологічних та імуногістохімічних досліджень встановлено, що комбінований препарат Капікор, що містить мельдоній та γ -бутиробетайн у дозі 56,5 мг/кг, виявляє нейро- і гліопротекторні властивості, забезпечує збереження якісної і кількісної структури тканин головного мозку, функціональних можливостей нейронів в зоні ішемії, запобігає їх некрозу і гальмує розвиток процесів апоптозу. Антиапоптозна складова відіграє найважливішу роль в механізмі церебропротекторної дії даного препарату. За рівнем церебропротекторної активності препарат Капікор за сукупністю досліджених показників достовірно перевершує активність референс-препарату γ -бутиробетайну, а за ряду параметрів – і вплив триметилгідразинію пропіонату.

Ключові слова: антиапоптозна активність, мельдоній, γ -бутиробетайн, церебральна ішемія

Ключовою умовою підтримки гомеостазу в багатоклітинних організмах є природний баланс між розподілом і загибеллю клітин. Встановлено, що поряд з програмою, яка регулює клітинний розподіл, існує особлива генетична програма, яка забезпечує визначений за часом життєвий цикл клітини і при несприятливих умовах призводить її до загибелі [2, 4, 16]. У нормі основна біологічна роль такої генетично запрограмованої смерті полягає у встановленні потрібної рівноваги між процесами проліферації та загибелі клітин, що в одних ситуаціях забезпечує стабільний стан організму, в інших – ріст, в третіх – атрофію тканин і органів.

За умов патології uszkodження органів починається на молекулярному або клітинному рівні. Реакція клітин на пошкодження залежить від типу, тривалості дії та тяжкості фактора, що ушкоджує. За несприятливих умов розвивається смерть клітини як кінцевий результат її пошкодження або дегенеративно-дистрофічних змін [15]. Клітинна смерть при такому варіанті розвитку подій може відбуватися шляхом як некрозу, так і апоптозу [8, 13].

Таким чином, апоптоз є загальним механізмом запрограмованої загибелі клітин в нормальних і патологічних процесах [2, 3, 16], а детермінація загибелі клітин та її регуляція – однією з центральних проблем клітинної біології.

Ішемія головного мозку викликає розвиток гіпоксії, яка запускає каскад патологічних процесів, що призводять до загибелі нейронів, в основному – шляхом некрозу. Апоптоз – морфологічний прояв запрограмованої загибелі нейронів – асоціюється,

в першу чергу, з нормальним функціонуванням центральної нервової системи. Однак при ряді патологічних станів, в тому числі при церебральній ішемії, рівень апоптозу істотно зростає [11].

Отже, дослідження апоптозу є важливим і високоінформативним елементом не тільки вивчення механізмів розвитку ішемічного ураження головного мозку, а й способом контролю ефективності проведеної церебропротекторної терапії.

У зв'язку з цим з метою поглибленого вивчення механізмів церебропротекторної дії комбінованого препарату, що містить мельдонію дигідрат і γ -бутиробетайну дигідрат (торговельна назва – Капікор), значний науковий і практичний інтерес становить дослідження процесів апоптозу в ішемізованих тканинах головного мозку тварин на фоні розвитку гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК), що і стало метою даного дослідження.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проводилися відповідно до директиви Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою [10].

Вивчення церебропротекторних властивостей препарату Капікор проведено на моделі гострого порушення мозкового кровообігу [1, 11] на 90 білих нелінійних щурах обох статей, масою 180–200 г, які були розподілені на 5 досліджуваних груп:

- група 1 – інтактний контроль (10 тварин);
- група 2 – контрольна патологія (20 тварин);
- група 3 – щурі з ГПМК, що отримували Капікор у дозі 56,5 мг/кг (за сумою діючих речовин), що відповідає ED₅₀ за церебропротекторною активністю (20 тварин);
- група 4 – щурі з ГПМК, які отримували триметилгідразинію пропіонат в еквівалентній дозі 42,4 мг/кг (20 тварин);
- група 5 – щурі з ГПМК, які отримували субстанцію γ-бутиробетайну (ГББ) в еквівалентній дозі 14,1 мг/кг (20 тварин).

Починаючи з першого дня експерименту і протягом 20 днів всі тварини отримували досліджуваний і референтні препарати у відповідних дозах, щодня одноразово шляхом внутрішньошкірного введення за допомогою зонда у вигляді водного розчину або суспензії в загальному об'ємі 0,5 мл. Тварини груп інтактного контролю і контрольної патології отримували еквівалентну кількість фізіологічного розчину. На 5-ту добу дослідження через годину після останнього введення препаратів у тварин проводили відтворення ГПМК шляхом білатеральної оклюзії загальних сонних артерій [1, 9, 11, 14].

Кількісний аналіз інтенсивності апоптозу виконували методом розрахунку індексу апоптозу (IA) – відношення числа TUNEL-позитивних клітин до загальної кількості клітин у полі зору, вираженого у відсотках.

Ідентифікацію апоптозних клітин у тканинах головного мозку проводили імуногістохімічно на напівтонких парафінових зрізах методом TUNEL-реакції (Tdt-mediated X-DUTP nick end labeling) за допомогою наборів «In Situ Cell Death Detection Kit, AP» виробництва «Roche Diagnostics» (Німеччина) (кат. №.11 684 809 910, сер. № 11888800) [8].

Загальну статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента та непараметричних методів аналізу (Mann-Whitney U Test) за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA 7.0, StatPlus 2009 та MS Excel 2007 [5–7] і представляли у вигляді порівняльних таблиць з результатами різних груп спостереження.

Результати та їх обговорення

У ході дослідження були виготовлені мікропрепарати зі свідомо відсутнім і присутнім апоптозним маркуванням клітин (негативний і позитивний контроль – рис. 1А, 1Б відповідно).

Клітини, що мають червоне / червоно-синє / червоно-коричневе забарвлення по периметру ядра або містять ядерні фрагменти в цитоплазмі, реєструвалися як TUNEL-позитивні (рис. 1Б). У негативному контролі подібні клітини були відсутні (рис. 1А).

При вивченні мікропрепаратів досліджуваних груп було виявлено, що у всіх групах є TUNEL-позитивне забарвлення у всіх зонах кори, гіпокампа і білої речовини в обох півкулях. Морфологія апоптозних клітин була незмінною, незалежно від місця локалізації.

З огляду на те, що в білій речовині апоптозу піддаються лише гліальні клітини, а також той факт, що спостерігається пряма залежність між рівнем апоптозу в різних зонах, зупинимось на описі апоптозу в сенсомоторній зоні кори і гіпокампі.

В групі інтактних тварин клітини з TUNEL-позитивним забарвленням зустрічалися не в кожному полі зору (рис. 1В), але в кожному мікро-

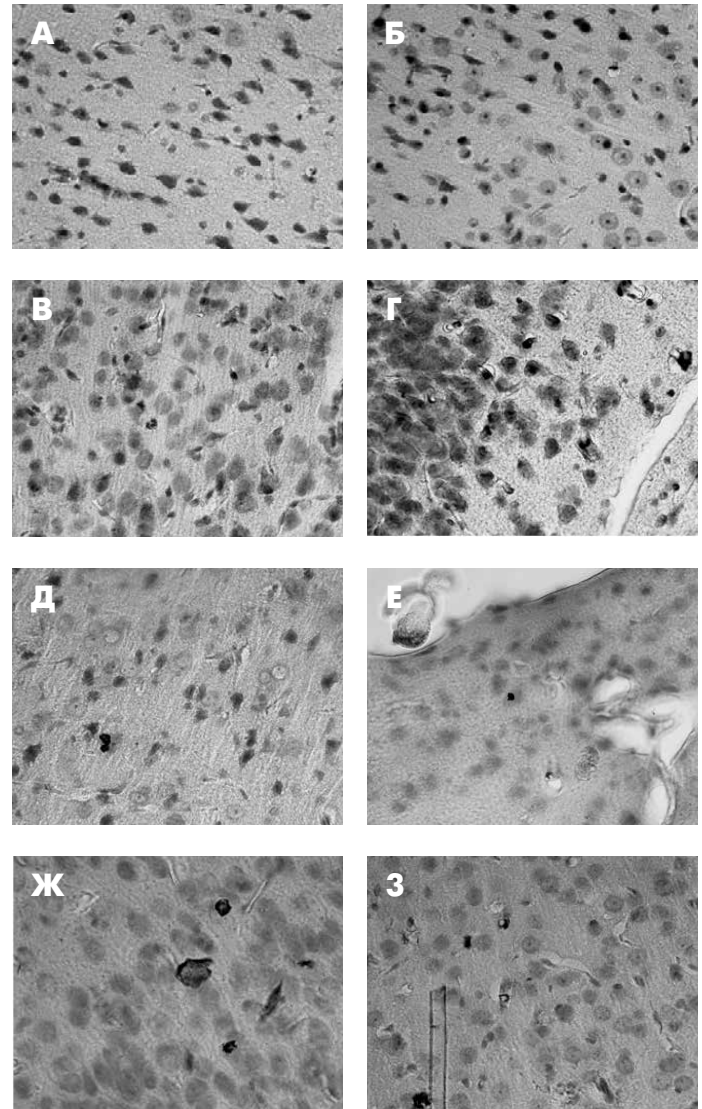


Рис. 1. Морфоструктура головного мозку щурів. TUNEL-реакція, Fast Red, гематоксилін. 36. ×400.

- Негативний контроль апоптозного маркування. Відсутність TUNEL-позитивних клітин.
- Позитивний контроль апоптозного маркування. Висока щільність TUNEL-позитивних клітин.
- Інтактний контроль. Відсутність TUNEL-позитивних клітин.
- Контрольна патологія. Чисельні апоптозні клітини.
- Капікор. Поодинокі апоптозна клітина.
- Триметилгідразиній. Поодинокі TUNEL-позитивні клітини на початковій стадії процесу.
- ГББ. 4 TUNEL-позитивні клітини на різних стадіях апоптозу

препараті. При розрахунку індексу апоптозу його величина в цій групі становила 2,79% (рис. 2).

При дослідженні мікропрепаратів у групі контрольної патології було виявлено достовірне посилення апоптозу на фоні відтворення порушення кровопостачання головного мозку у щурів. Так, церебральна ішемія призводила до збільшення рівня апоптозу в тканинах мозку тварин даної групи в 5 разів порівняно з інтактною, про що свідчить IA, який в цій групі становив 13,78% (див. рис. 2). У мікропрепаратах в кожному полі зору зустрічалось до 16–17 клітин з TUNEL-позитивним забарвленням. Особливо щільно апоптозні

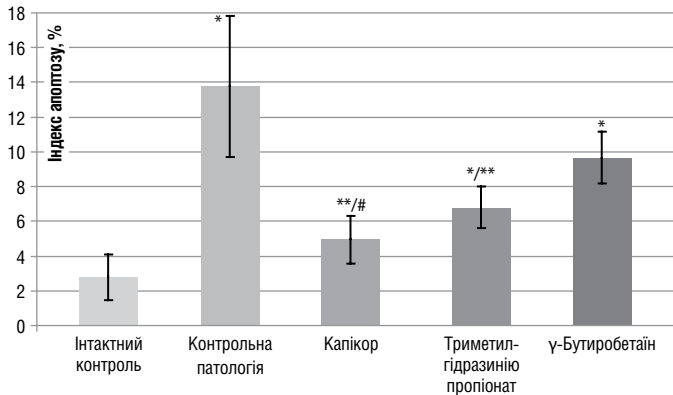


Рис. 2. Вплив препарату Капікор та препаратів порівняння на індекс апоптозу головного мозку щурів з ГПМК

Примітка: * – відмінності вірогідні щодо інтактних тварин ($p \leq 0,05$);
 ** – відмінності вірогідні щодо групи контрольної патології ($p \leq 0,05$);
 # – відмінності вірогідні щодо тварин, які отримували ГББ ($p \leq 0,05$).

клітини були розташовані в III–V шарах кори і гіпокампі (див. рис. 1Г). На окремих ділянках виявляли цілі групи нейроцитів в стані апоптозу. Більшість клітин містили ядра, забарвлені в синій колір, по периметру яких темно-червоним / червоно-коричневим чітко профарбовувався фрагментований хроматин. У частині клітин фрагменти ДНК виявлялися також в цитоплазмі у вигляді червоних грудочок ядерного хроматину.

При використанні препарату Капікор для лікування щурів з ГПМК число TUNEL-позитивних клітин, що містять чітко профарбовані мітки ядра і цитоплазми, знижувалося до 4,94%, що було майже в 3 рази менше, ніж у тварин групи контрольної патології, та не мало статистичних відмінностей від інтактної групи (див. рис. 2). Дані клітини були рівномірно розподілені по всіх зонах головного мозку. При цьому в полі зору мікроскопа, як правило, спостерігалось не більше 2–3 апоптозних клітин (див. рис. 1Д, 1Е).

Рідко зустрічалися випадки апоптозу, які характеризувалися поліморфізмом. Так, значна частина TUNEL-позитивних клітин перебувала на початковій стадії процесу, що візуалізувалося забарвленням по периметру ядра. Лише поодинокі апоптозні клітини були на стадії завершення процесу, що характеризувався повним здавленням ДНК ядра в щільну грудочку з темно червоно-синім забарвленням.

При вивченні мікропрепаратів тварин, які отримували триметилгідразиній, виявлялася морфологічна картина, ідентична вищеописаній, але з більш вираженими ознаками патології. Так, частка специфічно забарвлених апоптозних клітин знижувалася до 6,8%, що було достовірно в 2 рази менше, ніж у групі контрольної патології, але, тим не менш, статистично не досягало інтактного рівня (див. рис. 2). TUNEL-позитивні клітини були рівномірно розподілені по всіх зонах головного мозку, при цьому в більшості полів зору ідентифікувалися не більше 3–4 клітин у стані апоптозу (див. рис. 1Ж). Як правило, у таких клітин виявлялося інтенсивне зафарбовування ядра по периметру, що вказує на початкову стадію розвитку апоптотичного процесу, зрідка спостерігалися цитоплазматичні мітки.

На відміну від описаної картини, лікування тварин з ГПМК субстанцією ГББ призводило до зниження рівня частки TUNEL-позитивних клітин – до 9,66%, що було в 1,4 разу менше, ніж у групі контрольної патології, але не відрізнялося від неї достовірно, а також поступалося показнику тварин, які отримували

препарат Капікор (див. рис. 2). Найбільш часто клітини з ознаками апоптозного маркування спостерігалися в III–V шарах кори головного мозку щурів, при цьому в полі зору, як правило, виявлялося не більше 4–5 TUNEL-позитивних клітин, з різним ступенем вираженості апоптозного маркування. При вивченні мікропрепаратів в одному полі зору можна було виявити клітини на пізніх стадіях апоптозу та ті, які тільки вступають у даний процес (див. рис. 1З). Більшість випадків апоптозу в даній групі характеризувалися поліморфізмом.

Таким чином, аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок про те, що загибель нейроцитів і гліальних клітин після розвитку ішемії головного мозку відбувається не тільки шляхом некрозу, а й пов'язана з активацією апоптозу. Хоча апоптозні клітини виявляються і в інтактних тканинах мозку, їх кількість при цьому незначна, вони розташовані випадковим чином, що не є характерною рисою морфологічно нормального головного мозку. Після розвитку ішемії виявляється значна популяція змінених нейроцитів і гліальних клітин з наявністю незворотних апоптозних процесів. При цьому число клітин з ознаками апоптозу зростає в 5 разів. Змінюється і локалізація таких клітин – вони концентруються переважно в глибоких шарах кори і гіпокампа.

Всі препарати, вивчені в ході даного експерименту, в тій чи іншій мірі інгібували ішемічний проапоптозний ефект, але найбільшою мірою антиапоптозна дія була виражена при використанні комбінованого препарату Капікор, що містить мельдоній та γ-бутиробетаїн для лікування тварин з ГПМК.

Зменшення кількості апоптозних клітин під впливом даного препарату можна пояснити його регуляторним впливом на процеси метаболізму нейронів, що сприяє збалансуванню енергопродукції та їх клітинного гомеостазу за умов ішемії та як наслідок – зумовлює підвищення їх стійкості до агресивного впливу гіпоксії, вільних радикалів, медіаторів запалення та інших факторів несприятливих умов існування в патологічно змінених тканинах головного мозку.

Результати проведених досліджень підтвердили вагомий роль антиапоптозної складової в механізмі церебропротекторної дії препарату Капікор. За умов розвитку ГПМК даний препарат суттєво інгібує активацію апоптозу нейроцитів і гліальних клітин у структурах головного мозку, викликану ішемією та за рівнем антиапоптозної активності достовірно перевищує референт-препарат ГББ і недостовірно – триметилгідразиній.

Висновки

1. За результатами імуногістохімічних досліджень препарат Капікор виявляє нейропротекторні властивості, забезпечує збереження якісної та кількісної структури тканин головного мозку і гальмує розвиток процесів апоптозу.
2. Антиапоптозна складова відіграє найважливішу роль в механізмі церебропротекторної дії препарату Капікор.
3. За рівнем впливу на процеси апоптозу препарат Капікор за сукупністю досліджених показників достовірно перевершує активність референт-препарату γ-бутиробетаїну, а за рядом параметрів – і вплив триметилгідразинію.

Додаткова інформація. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список використаної літератури

1. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Методические рекомендации ГФЦ МЗ Украины / И.С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев и др. – К., 2010. – 81 с.
2. Егорова И.Ф., Серов Р.А. Апоптоз и некроз: взаимоотношение явлений // Морфология. – 2004. – Т. 126, №4. – С. 71–75.
3. Лущников У.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). – М.: Медицина, 2001. – 192 с.
4. Матвеева Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы // Pacific Medical Journal. – 2003. – №4. – С. 12–16.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
6. Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
7. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.
8. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation / Ed. H.J. Rode. – 4-th edition. – Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2008. – 180 p.
9. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies / A. Canazza, L. Minati, C. Boffano et al. // Frontiers in Neurology. – 2014. – Vol. 5, №19. – 15 p. – Doi : 10.3389/fneur.2014.00019.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose : Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
11. Farkas E. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases / E. Farkas, P.G.M. Luiten, F. Bari // Brain Research Reviews. – 2007. – Vol. 54, №1. – P. 162–180.
12. Fischer U. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease / U. Fischer, K. Schulze-Osthoff // Pharmacol Rev. – 2005. – Vol. 57. – P. 187–215.
13. Kroemer G. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death / G. Kroemer, W.S. El Deiry, P. Golstein // Cell Death Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 1463–1467.
14. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke / T.M. Woodruff, J. Thundyil, Sung-Chun Tang et al. // Molecular Neurodegeneration. – 2011. – Vol. 6, Vol/ 11. – 19 p. – Doi: 10.1186/1750-1326-6-11.
15. Sharma A.K. Activation of apoptotic processes during transition from hypertrophy to heart failure in guinea pigs / A.K. Sharma, S. Dhingra, N. Khaper, P.K. Singal // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. 1384–1390.
16. Taylor R.C. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level / R.C. Taylor, S.P. Cullen, S.J. Martin // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – Vol. 9. – P. 231–241.

Резюме

Експериментальна оцінка впливу препарату Капикор на процеси апоптозу в тканих головного мозгу крис с церебральною ішемією

І.А. Зупанец, С.К. Шебеко, І.А. Отришко

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Апоптоз – морфологічне проявлення запрограммованої гібелі нейронів, асоціюється, в першу чергу, з нормальним функціонуванням центральної нервової системи. Однак при ряду патологічних станів, в том числі при церебральній ішемії, рівень апоптозу суттєво зростає. Метою даного дослідження стало вивчення механізмів церебропротекторного дії комбінованого препарату Капикор, що містить мелдоній і γ -бутиробетайн, – вивчення процесів апоптозу в ішемізованих тканинах головного мозгу тварин на фоні розвитку гострого порушення мозкового кровообігу.

По результатам гистоморфологічних і імуногістохімічних досліджень встановлено, що препарат Капикор в дозі 56,5 мг/кг надає нейро- і гліопротекторні властивості, забезпечує збереження якості та кількісної структури тканин головного мозку, функціональних можливостей нейронів в зоні ішемії, запобігає їх некрозу і затримує розвиток процесів апоптозу. Антиапоптозна складова грає важливу роль в механізмі церебропротекторного дії даного препарату. По рівню церебропротекторної активності препарат Капикор по сукупності досліджуваних показувачів достовірно перевищує активність референтного препарату γ -бутиробетайна, а по ряду параметрів – і вплив триметилгідрозинію пропіонату.

Ключові слова: антиапоптозна активність, мелдоній, γ -бутиробетайн, церебральна ішемія

Summary

Experimental assessment of the drug «Capicor» influence on the processes of apoptosis in brain tissue of rats with cerebral ischemia

I.A. Zupanets, S.K. Shebeko, I.A. Otrishko

National University of Pharmacy, Kharkiv

Apoptosis – programmed morphological manifestation of neuronal death is associated primarily with the normal functioning of the central nervous system. However, a number of pathological states, including cerebral ischemia, significantly increases the level of apoptosis. The aim of this study was to investigate the mechanisms of cerebroprotective action of the drug «Capicor» – the study of apoptosis in the ischemic brain tissue of animals after acute cerebrovascular accidents.

As a result of histomorphological and immunohistochemical studies revealed that «Capicor» at the dose of 56.5 mg/kg has neuro- and glioprotective properties, ensures the qualitative and quantitative structure of the brain tissue, the functionality of neurons in an area of ischemia, prevents necrosis and hinders the development of apoptotic processes. Anti-apoptotic component plays an important role in the mechanism of the cerebroprotective action of «Capicor». The level of cerebroprotective activity of the «Capicor» jointly investigated parameters was significantly superior to an asset-reference of the drug γ -butyrobetaine, and a number of parameters – the influence of trimethylhydrazinium propionate.

Key words: anti-apoptotic activity, meldonium, γ -butyrobetaine, cerebral ischemia