

А.Е. Левих,
Н.С. Бондаренко,
С.М. Дронов,
І.В. Твердохліб,
В.Й. Мамчур,
В.І. Жиліюк

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ СУМІСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПІРАЦЕТАМУ І МЕТФОРМІНУ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ КОГНІТИВНИХ РОЗЛАДІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра фармакології і клінічної фармакології
(зав. – д. мед. н., проф. В.І. Жиліюк)
вул. В. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»
Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology
V. Vernadsky str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
e-mail: vzhyluk@gmail.com

Цитування: Медичні перспективи. 2020. Т. 25, № 3. С. 30-39

Cited: Medicni perspektivi. 2020;25(3):30-39

Ключові слова: алоксан-індукована гіперглікемія, діабетична енцефалопатія, когнітивний дефіцит, метформін, пірацетам

Ключевые слова: аллоксан-индуцированная гипергликемия, диабетическая энцефалопатия, когнитивный дефицит, метформин, пирacetам

Key words: alloxan-induced hyperglycemia, diabetic encephalopathy, cognitive deficit, metformin, piracetam

Реферат. Експериментальне обґрунтування цілесобразності комбінованого застосування пірацетаму і метформіну для фармакологічної корекції когнітивних розладів в умовах тривалої гіперглікемії. Левих А.Є., Бондаренко Н.С., Дронов С.М., Мамчур В.Й., Твердохліб І.В., Жиліюк В.І. Стратегічно важливими ланками розвитку когнітивного дефіциту при діабетичній енцефалопатії вважають хронічну гіперглікемію, інсулінорезистентність, ендотеліальну дисфункцію і порушення цілості гематоенцефалічного бар'єра. З урахуванням цього, одним з сучасних трендів оптимізації лікування порушень когнітивних функцій, індуцируваних тривалою гіперглікемією, можна вважати спільне призначення препаратів з існуючою антигіперглікемічною і ноотропною активністю, зокрема, метформіну з пірацетамом. Показано, що в умовах експериментальної аллоксан-індукованої гіперглікемії пірацетам має недостатню ноотропну потенціал для усунення когнітивного дефіциту. Метформін надає незначительний ноотропний ефект при короткотривалому використанні в низьких дозах, при цьому не проявляє цих властивостей при тривалому введенні. Показано, що при комбінованому застосуванні з пірацетамом метформін потенціює його антиамнестичні властивості, що сприяє відновленню когнітивних функцій, ослаблених гіперглікемією. Припускається, що механізми такого синергізму опосередковуються зниженням вмісту раних і пізніх маркерів руйнування білкових молекул, рівня стабільних метаболітів оксиду азоту в корі головного мозку, а також суттєвим обмеженням проявлених ультраструктурних руйнівних змін нейронів гіпокампа з одночасним покращенням стану мікроциркуляторного русла. Отримані результати вказують на цілесобразність застосування метформіну спільно з ноотропами для запобігання або лікування когнітивних порушень, які виникають внаслідок цукрового діабету.

Abstract. Experimental substantiation of the expediency of the combined use of piracetam and metformin for pharmacological correction of cognitive disorders in conditions of prolonged hyperglycemia. Lievykh A.E., Bondarenko N.S., Dronov S.N., Mamchur V.I., Tverdokhlib I.V., Zhyliuk V.I. Chronic hyperglycemia, insulin resistance, endothelial dysfunction, and disturbance of the integrity of the blood-brain barrier are considered as strategically important links in the development of cognitive deficits in diabetic encephalopathy. Taking this into account, one of the modern trends in the optimization of the treatment of cognitive impairments induced by prolonged hyperglycemia is the co-administration of agents with antihyperglycemic and nootropic activity, in particular, metformin with piracetam. It has been shown that under conditions of experimental alloxan-induced hyperglycemia, piracetam has insufficient nootropic potential for eliminating cognitive deficits. Metformin has a weak nootropic effect

in short-term use in low doses, without exhibiting these properties in prolonged administration. When combined with piracetam, metformin potentiates its anti-amnesic properties, which helps to restore cognitive functions impaired by hyperglycemia. It is assumed that the mechanisms of such synergism are mediated by a decrease in the content of early and late markers of the destruction of protein molecules, the level of stable nitric oxide metabolites in the cerebral cortex, as well as a significant limitation of the manifestations of ultrastructural destructive changes in hippocampal neurons with a simultaneous improvement in the state of its microvasculature. The obtained results indicate the expediency of the combined use of metformin with nootropic agents for the prevention or treatment of cognitive impairments that occur as a result of diabetes mellitus.

Натепер цукровий діабет (ЦД), який вважають неінфекційною епідемією ХХІ століття, визнається незалежним фактором ризику розвитку діабетичної енцефалопатії, характерною особливістю якої є прогресуючий розвиток когнітивної дисфункції. До найбільш значущих механізмів її появи при ЦД відносять порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру, гіперглікемію, інсулінорезистентність, дисфункцію судин мікроциркуляторного русла та ендотелію [2].

Розвиток когнітивних розладів у хворих на ЦД у першу чергу опосередковується хронічною гіперглікемією, яка зумовлює активацію механізмів ушкодження ЦНС, що проявляється, насамперед, індукцією апоптозу нейронів гіпокампаально-амигдалярного комплексу [7]. Універсальним механізмом розвитку дефіциту пам'яті при діабетичній енцефалопатії вважають ендотеліальну дисфункцію [3], оскільки діабет змінює функцію ендотелію і проникність гематоенцефалічного бар'єру, тим самим порушуючи кровотік та регіональний метаболізм у головному мозку [5]. Процеси когнітивного старіння у хворих на ЦД також певною мірою пояснює концепція «інсулінорезистентності головного мозку». Виснаження інсулінових рецепторів у центральній нервовій системі супроводжується ослабленням нейропротективного впливу інсуліну з подальшим розвитком гіпокампаальної дисфункції, когнітивних розладів і мнестичного дефіциту [4].

Ураховуючи, що стратегічно важливими ланками патогенезу розладів пам'яті у хворих на ЦД є хронічна гіперглікемія, інсулінорезистентність та ендотеліальна дисфункція [2], одним з сучасних трендів оптимізації лікування порушень когнітивних функцій доцільно вважати сумісне призначення препаратів з наявною антигіперглікемічною та ноотропною активністю, що й визначило мету цього експериментального дослідження.

Метою нашої роботи було експериментальне визначення доцільності застосування комбінації метформіну з пірацетамом в якості засобів фармакологічної корекції когнітивних порушень за умов тривалої гіперглікемії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні використано 70 білих статево-дорослих щурів лінії Вістар масою 230-350 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при вільному доступі до води та їжі в умовах інвертованого світла 8.00 – 20.00 при температурі повітря $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Експеримент проведений на базі кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпро). Усі процедури (анестезія, введення лікарських засобів, виведення тварин з експерименту тощо) повною мірою відповідали принципам Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою (Страсбург, 1986), Директиви № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою (2010), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та висновку комісії з питань біомедичної етики ДЗ ДМА (протокол № 8 від 17.12.2019 р.).

Тварини були розподілені на п'ять основних груп (n=50), групу активного (алоксановий діабет, n=10) та групу пасивного інтактного (n=10) контролю. Усім гризунам основних груп та групи активного контролю для відтворення експериментального стану тривалої гіперглікемії одноразово підшкірно вводився водний розчин алоксану моногідрату в дозі 150 мг/кг у вигляді 5% розчину в цитратному буфері, рН 4,5. Рівень глюкози крові визначався на 11 добу після введення алоксану за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для подальших досліджень використані тільки тварини з підвищеним рівнем глюкози (>11 ммоль/л). Група інтактних тварин отримувала, підшкірно фізіологічний розчин у відповідних об'ємах.

З метою вивчення стану когнітивних функцій головного мозку по мірі прогресування алоксаніндукованої патології підшлункової залози та впливу дослідних лікарських засобів з наявною антигіперглікемічною та ноотропною активністю на перебіг зазначеного процесу щурам 1-ї, 2-ї та 3-ї основних груп (n=10 у кожній) 1 раз на добу внутрішньошлунково протягом 20 днів

вводили метформін у дозах, еквівалентних добовому терапевтичному діапазону для людини: 250, 500 і 750 мг/кг відповідно (Глюкофаж®, таблетки 500 мг, компанія «Merck Santé S.A.S.», Франція). Щурам 4-ї основної групи (n=10) 1 раз на добу інтрагастрально протягом 20 днів вводили пірацетам дозою 400 мг/кг (Луцетам® (пірацетам), таблетки 1200 мг, компанія «Egis Pharmaceuticals PLC», Угорщина), 5-ї групи (n=10) в аналогічному режимі – комбінацію зазначених засобів (метформін 250 мг/кг + пірацетам 400 мг/кг). Тваринам групи активного контролю внутрішньошлунково вводили дистильовану воду. Оцінку ефективності експериментальної терапії проводили на 6 та 20 добу після введення дослідних засобів у тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ). Оцінним показником відтворення навички УРПУ слугував латентний період (ЛП) заходу тварин до темного відсіку камери та рівень амнезії умовної навички [9].

По мірі прогресування алоксанової гіперглікемії (АГ) оцінювався рівень глюкози крові, активність процесів вільнорадикального окиснення та стан системи обміну оксиду азоту в гомогенатах неокортексу щурів, функціональний стан ендотелію судин, а також ультраструктурні зміни гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) та судинного русла гіпокампу.

Рівень глюкози крові оцінювали на 20 добу експерименту у щурів усіх груп за допомогою глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США).

Маркерами окиснювального стресу слугували рівні продуктів окисної модифікації білкових молекул – альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і кетонфенілгідрозонів (КФГ), а стану системи обміну оксиду азоту – рівень його стабільних метаболітів NO_x у неокортексі. Для їх визначення на 20-у добу щурів 4-ї і 5-ї основних груп, а також груп активного та інтактного контролю виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом, після чого проводили забір крові та екстракцію тканин неокортексу, з яких готували гомогенати. Вміст АФГ і КФГ [15], а також NO_x [6] в гомогенатах кори головного мозку визначали спектрофотометрично за загальноприйнятими методиками.

Вивчення стану ендотеліотромбоцитарного гомеостазу проводили на 20-у добу у щурів 5-ї основної групи, а також груп активного та інтактного контролю шляхом оцінки системної продукції ендотеліального оксиду азоту та активності конститутивної NOS у тромбоцитах. Рівень стабільних метаболітів NO_x [6] визначали

спектрофотометрично, а вміст фізіологічної ізоформи синтази оксиду азоту – в суспензії тромбоцитів за рівнем диформазану [8].

Оцінку ультраструктурних змін ГЕБ та судинного русла гіпокампу виконували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 ("SELMIP", Україна) при напрузі прискорення 70-75кВ і первинних збільшеннях від 4000 до 20000 за стандартною схемою з попередньою підготовкою матеріалу згідно із загальноприйнятими стандартами [11].

Дані, отримані в експерименті, обробляли методами біостатистики за допомогою програми STATISTICA 6.1 (серійний номер AGAR 909 E415822FA). Установлення достовірності міжгрупових відмінностей проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента, критерію рангових сум Вілкоксона, критерію Манна-Уїтні та методу однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA [1].

Рівень достовірності статистичної значущості відмінностей результатів досліджень становив $p < 0,05$; $p < 0,01$ та $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як свідчать отримані нами результати, курсове 20-добове внутрішньошлункове введення метформіну в дозі 250 мг/кг призводило до зниження рівня глюкози на 14,8% ($p < 0,05$) лише порівняно з 1 добою експерименту, однак не групою активного контролю. У свою чергу, при використанні метформіну в дозі 500 мг/кг рівні глюкози наприкінці експерименту були нижчими на 18,9% ($p < 0,05$) по відношенню до початкових значень та на 21,9% ($p < 0,01$) – по відношенню до тварин групи АГ. При повторних введеннях засобу дозою 750 мг/кг зазначені показники були меншими на 28,7% ($p < 0,05$) та 25,7% ($p < 0,01$) відповідно (табл. 1).

Отже, метформін за умов хронічної гіперглікемії дозозалежно знижує її ступінь, однак у досліджених дозах не приводить до повного відновлення фізіологічних рівнів глюкози у крові. Отримані результати узгоджуються з даними літератури, які свідчать, що основною функцією метформіну є регуляція гомеостазу глюкози, насамперед шляхом впливу на процеси глюконеогенезу та глікогенолізу в гепатоцитах [14], що опосередковується рядом механізмів: пригніченням активності мітохондріальних ферментів глюконеогенезу, зменшенням поглинання глюконеогенних субстратів гепатоцитами та антагонізмом із сигнальним шляхом глюкагону [12].

Аналіз вивчення стану мнестичних функцій показав, що у тварин з АГ спостерігалися виражені прояви когнітивного дефіциту. Зокрема, на

6-у добу тестування УРПУ тривалість ЛП скорочувалася на 56% ($p=0,064$) порівняно з пасивним контролем, а на 20-у добу – на 61,5% ($p<0,05$) по

відношенню до значення відповідного показника в групі інтактних тварин (табл. 2).

Таблиця 1

Рівень глюкози крові у щурів з алоксан-індукованою гіперглікемією за умов експериментальної терапії метформіном ($M\pm m$, $n=10$)

Група тварин	Рівень глюкози, ммоль/л	
	1 доба	20 доба
Пасивний контроль (інтактні)	5,91±0,410	5,51±0,315
Активний контроль (АГ)	18,08±1,269 ^{***}	17,47±1,143 ^{***}
Метформін (250 мг/кг)	16,52±0,805 ^{***}	14,08±0,797 [*]
Метформін (500 мг/кг)	16,84±1,067 ^{***}	13,65±0,882 ^{#**}
Метформін (750 мг/кг)	18,19±1,463 ^{***}	12,97±1,135 ^{#**}

Примітки: *** – $p<0,001$ по відношенню до показників пасивного контролю; # – $p<0,05$ – до показників групи з АГ; * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ – до показників на 1-у добу дослідження.

Доведено, що курсове внутрішньошлункове введення метформіну в різних дозах у щурів з АГ на 6-у добу тестування УРПУ характеризувалося вираженою тенденцією до зростання тривалості ЛП лише при використанні дослідного гіпоглікемічного засобу в дозі 250 мг/кг, що

викликало збільшення показника у 2,78 раза ($p=0,05$) порівняно з групою активного контролю. При цьому рівень амнезованості тварин на 20-у добу після введення метформіну у всіх дозових режимах був наближений до показників групи активного контролю (табл. 2).

Таблиця 2

Тривалість латентного періоду УРПУ у щурів з алоксан-індукованою гіперглікемією за умов повторних введень метформіну та його комбінації з пірацетамом ($M\pm m$, $n=10$)

Умови експерименту	Латентний період, сек		
	5 доба	6 доба	20 доба
Пасивний контроль (інтактні)	22,7±4,65	173,5±6,50	165,3±14,70
Активний контроль (АГ)	20,8±1,99	42,7±10,75 ($p=0,06$)	33,3±9,39*
Метформін (250 мг/кг)	18,6±3,81	118,8±25,13 ($p=0,05$)	48,9±9,63
Метформін (500 мг/кг)	22,2±4,79	94,1±21,62	40,1±8,28
Метформін (750 мг/кг)	20,6±3,43	92,6±24,76	47,8±17,13
Пірацетам (400 мг/кг)	19,3±3,99	104,0±25,67	85,3±26,09
Пірацетам (400 мг/кг) + метформін (250 мг/кг)	18,1±3,15	146,8±22,13 ^{###}	164,5±15,50 ^{###}

Примітки: * – $p<0,05$ – до групи тварин пасивного інтактного контролю; ^{###} – $p<0,01$; ^{####} – $p<0,001$ – до групи активного контролю (АГ).

Зазначено, що інтрагастральне застосування пірацетама в дозі 400 мг/кг тваринам з тривалою гіперглікемією сприяло деякому зростанню три-

валості латентного періоду порівняно з групою активного контролю, яке, однак, не мало статистично значущого характеру. У свою чергу,

сумісне використання пірацетама з метформіном (400/250 мг/кг) характеризувалося пролонгацією ЛП на 6 та 20 добу експерименту в 3,44 ($p < 0,01$) та 4,94 ($p < 0,001$) раза відповідно по відношенню до аналогічного показника групи АГ. При цьому значення показника ЛП набутої навички, зареєстровані у тварин цієї групи, статистичного значущо перевищували показники групи пірацетама (табл. 2).

Отже, тривала АГ ініціює процеси, які призводять до амнезії набутої навички і, тим самим, викликає розвиток когнітивного дефіциту. Метформін сприяє дозозалежному зниженню рівня глюкози і, за умов короткострокового введення, у низькодозовому режимі (250 мг/кг) виявляє деяку ноотропну та антиамнестичну активність, однак не виявляє цих властивостей при 3-тижневому застосуванні. Ї експериментальна терапія пірацетамом не здатна повною мірою

попереджувати розвиток когнітивного дефіциту за умов АГ та гальмувати його подальше зростання. Метформін при сумісному використанні з пірацетамом потенціює антиамнестичні властивості ноотропа та сприяє відновленню когнітивних функцій, пригнічених тривалою гіперглікемією.

Цілком імовірно, що така особливість комбінованої терапії опосередкована синергізмом механізмів впливу інгредієнтів зазначеної композиції на стратегічно важливі ланки патогенезу когнітивного дефіциту, зумовленого тривалою гіперглікемією. Так, згідно з отриманими нами результатами, перебіг тривалої алоксан-індукованої гіперглікемії у щурів значно прискорював інтенсивність процесів окиснювальної модифікації білка в корі головного мозку, свідченням чого слугувало зростання концентрації АФГ та КФГ на 82,2% ($p < 0,001$) і 44,3% ($p < 0,001$) відповідно (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив пірацетама та його композиції з метформіном на вміст продуктів окисної модифікації білків, стабільних метаболітів оксиду азоту в гомогенатах неокортексу, а також глюкози крові у щурів з алоксан-індукованою гіперглікемією ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФГ у.о./г. білка	КФГ у.о./г. білка	NO _x , ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л
Пасивний контроль	0,75±0,056	1,15±0,036	22,3±3,29	6,7±0,55
Активний контроль (АГ)	1,37±0,074*	1,66±0,044*	45,7±6,25*	20,8±2,19*
Пірацетам (400 мг/кг)	1,28±0,078	1,45±0,040 [#]	37,6±2,90	18,8±1,97
Пірацетам (400 мг/кг) + метформін (250 мг/кг)	0,89±0,092 ^{##} *	1,31±0,082 ^{#*}	29,7±3,32 [#]	13,6±1,16 [#]

Примітки: * – $p < 0,001$ - до показників групи пасивного контролю; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ – до показників групи активного контролю; * – $p < 0,05$ – до показників у групі пірацетама.

Показано, що повторні, протягом 20 діб, внутрішньошлункові введення пірацетама в дозі 400 мг/кг сприяли зменшенню вмісту маркерів ОМБ у неокортексі, більшою мірою по відношенню до КФГ, рівень якого був на 12,6% ($p < 0,01$) нижчим порівняно з групою активного контролю. При цьому курсова комбінована терапія пірацетамом (400 мг/кг) та метформіном (250 мг/кг) сприяла зниженню вмісту АФГ та КФГ порівняно з групою активного контролю на 35% ($p < 0,01$) та 21,1% ($p < 0,05$) відповідно та водночас була ефективнішою монотерапії пірацетамом як по відношенню до АФГ – зниження на 30,5% ($p < 0,05$), так і КФГ – -9,6% ($p < 0,05$) (табл. 3).

Установлено, що відтворення експериментального еквівалента ЦД у щурів супроводжувалося збільшенням системної продукції оксиду

азоту в корі головного мозку: рівень стабільних метаболітів NO_x у неокортексі зростав у 2,05 раза ($p < 0,001$) порівняно з групою інтактного контролю (табл. 3).

Доведено, що статистично значуще зменшення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту спостерігалось лише в групі курсового комбінованого застосування пірацетама з метформіном, після введення яких рівень NO_x знижувався на 32,8% ($p < 0,05$) відносно аналогічного показника в групі АГ. При цьому статистично значуще зниження рівня глюкози крові на 34,6% ($p < 0,05$) порівняно з групою активного контролю також спостерігалось лише при 20-добовому сумісному введенні пірацетама з метформіном, проте не монотерапії пірацетамом (табл. 3).



Отже, перебіг тривалої алоксан-індукованої гіперглікемії у щурів супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення білкових молекул, а також збільшенням системної продукції оксиду азоту в неокортексі. Пірацетам при його сумісному використанні з метформіном статистично значущо знижує вміст ранніх і пізніх маркерів деструкції білкових молекул, а також рівень стабільних метаболітів оксиду азоту.

Отримані результати корелюють з повідомленнями літературних публікацій, згідно з якими гіперглікемія посилює продукцію активних форм кисню (АФК) у мітохондріях, тим самим індукуючи окиснювальний стрес, що приводить до окиснювальної модифікації ліпідів, білків і ДНК та, у кінцевому результаті – апоптозу клітини [12]. Крім того, викликане гіперглікемією підвищення пулу оксиду азоту полегшує перебіг реакції його взаємодії з супероксидним аніон-радикалом, результатом якої є утворення пероксинітриду, який виявляє набагато більшу руйнуючу здатність, ніж оксид азоту чи супероксид аніон [10]. Метформін, виконуючи роль промотору системи антиоксидантного захисту, сприяє прямому «захопленню» гідроксил-радикалу (ОН[•]) – основного агента, який викликає

деструктивні процеси в клітині; підвищує активність ендогенних антиоксидантних ферментів (глутатіонредуктази, каталази та супероксиддисмутази); інактивує НАДФН-оксидазу, призводячи до зростання цитозольного вмісту НАДФН і внаслідок цього – рівнів відновленого глутатіону, що ослабляє окиснювальну напругу, яка відіграє роль у патогенезі багатьох хвороб, у т.ч. діабету. До того ж підвищення рівня внутрішньоклітинного глутатіону, ймовірно, може попереджувати зв'язування молекули NO з супероксид аніоном, тим самим запобігати утворенню пероксинітриду і чинити специфічну цитопротекторну дію [12].

Аналіз впливу комбінації пірацетама з метформіном на функціональний стан ендотелію судин щурів з АГ показав, що тривала гіперглікемія супроводжувалася зменшенням рівня стабільних метаболітів NO_x на 36,2% (p<0,05) порівняно з групою пасивного контролю. При цьому пірацетам у поєднанні з метформіном (400/250 мг/кг) сприяв статистично значущому зростанню пулу фізіологічної ізоформи синтази оксиду азоту в тромбоцитах щурів на 17,5% (p<0,05) порівняно з групою АГ, однак не приводив до повного відновлення її активності до рівня групи інтактних тварин (табл. 4).

Таблиця 4

Рівень стабільних метаболітів оксиду азоту в плазмі крові та активність конститутивної NO-синтази в тромбоцитах щурів з АГ за умов введення пірацетама та його комбінації (M±m, n=10)

Групи тварин	NO _x , мкмоль/л	Активність NOS, нмоль/хв/10 ⁸ тромбоцитів
Пасивний контроль	42,72±5,358	16,89±0,809
Активний контроль (АГ)	27,26±3,144*	10,72±0,356*
Пірацетам (400 мг/кг)	33,03±3,892	12,44±0,629 [#]
Пірацетам (400 мг/кг) + метформін (250 мг/кг)	29,92±4,809	12,60±0,654 [#]

Примітки: * - p<0,05 – до показників групи пасивного контролю; [#] – p<0,05 – до показників, зафіксованих у групі активного контролю.

Отже, поєднання метформіну та пірацетама за умов алоксан-індукованої гіперглікемії підвищує вміст конститутивної NO-синтази оксиду азоту в тромбоцитах, що деякою мірою може свідчити про позитивний вплив комбінації на реологічні властивості крові. Відомо, що тривала гіперглікемія в результаті стійкої активації НАДФН-оксидази знижує внутрішньоклітинний пул НАДФН, який необхідний в якості кофактора ендотеліальної NO-синтази і тим самим редукує

генерацію NO й ендотелій-залежну вазодилатацию [12]. Метформін здатний модулювати вплив гіперглікемії на функцію ендотелію за рахунок збільшення фосфорильовання eNOS [13].

Згідно з результатами трансмісійної електронної мікроскопії, у стінці артеріол фронтального гіпокампу тварин з алоксан-індукованою гіперглікемією спостерігалася різке потовщення і розпушування базальної мембрани, мозаїчно виражена дистрофія, набрякання ендотеліальних

клітин і проліферація перицитів (рис. 1) порівняно з ультраструктурою артеріол гіпокампу інтактних тварин (рис. 2). При цьому сумісне

введення пірацетаму і метформіну (400/250 мг/кг) суттєво обмежувало внутрішньостінковий набряк артеріол і венул (рис. 3).

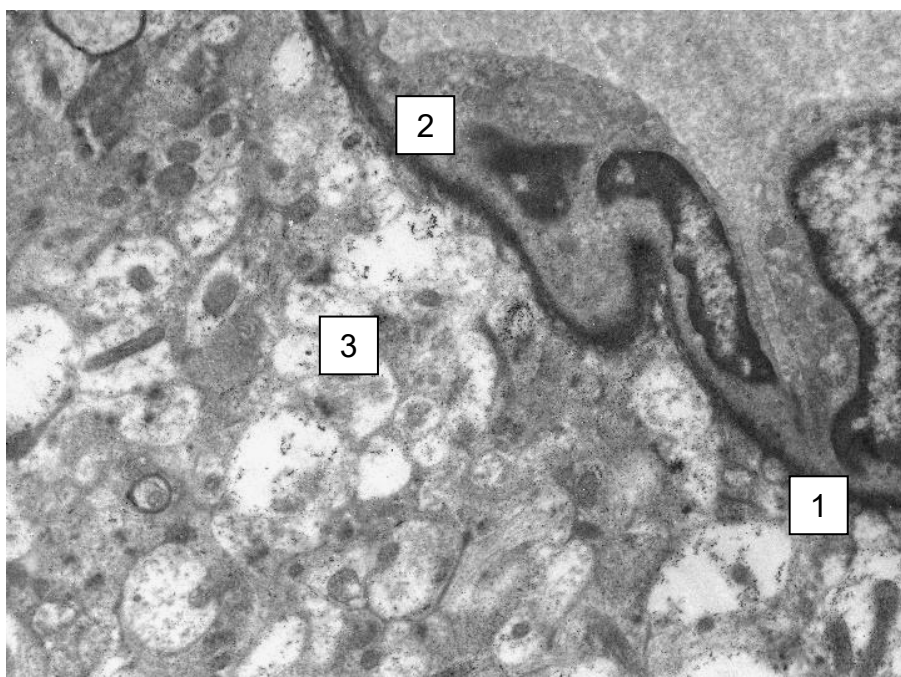


Рис. 1. Гіпокамп щура з алоксановим діабетом. Ділянка стінки артеріоли. Потовщення базальної мембрани (1), дистрофія і набрякання ендотеліальних клітин (2). Виражений периваскулярний набряк (3). $\times 10000$

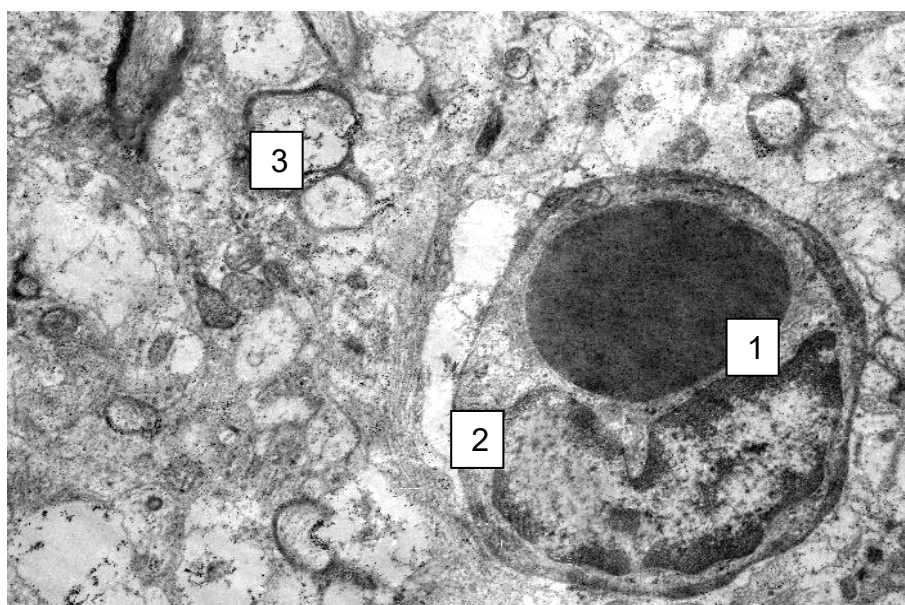


Рис. 2. Гіпокамп щура групи пасивного контролю. Гемокапіляр (1), структури гематоенцефалічного бар'єру (2) та поперечні профілі нервових волокон (3). Електроннограма $\times 10000$

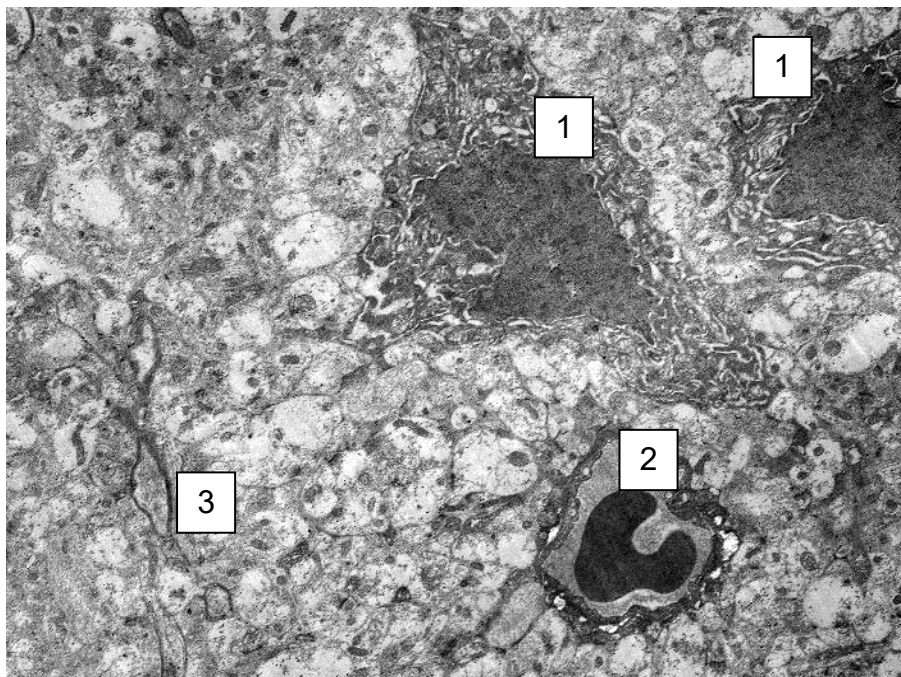


Рис. 3. Гіпокамп щура з алоксановим діабетом. Пірацетам + метформін (400/500 мг/кг). Пірамідні нейрони з незначними порушеннями ультраструктури (1). Прекапілярна артеріола (2). Незначний дифузний набряк тканини (3). Електронограма $\times 5000$

Показано, що дисфункція судинного апарату була представлена помірним потовщенням і розпушуванням базальної мембрани, дистрофією і набряком ендотеліоцитів. Спостерігався і незначний периваскулярний набряк навколо мікросудин приносячої і обмінної ланок гемато-мікроциркуляторного русла. Стінка гемокapілярів мала цілісну структуру, без ділянок фрагментації ендотелію або базальної мембрани. Міжєндотеліальні з'єднання і протяжність міжєндотеліальних щілин були наближені до нормальних величин (рис. 3).

Отже, аналіз проведених досліджень свідчить, що алоксан-індукована гіперглікемія у щурів призводить до суттєвих ультраструктурних змін як нейронального апарату, так і гематоенцефалічного бар'єру в гіпокампі експериментальних тварин, які є передумовою деструкції нейронів і подальшої ініціалізації процесів апоптозу. Курсова експериментальна терапія, заснована на одночасному комбінованому застосуванні пірацетаму з метформіном, не здатна повною мірою забезпечити відновлення ультраструктурних змін у гіпокампі, проте істотно обмежує прояви деструктивних змін нейронів, водночас покращуючи стан мікроциркуляторного русла. Отримані дані в цілому погоджуються зі ступенем антиамнестичної активності цього медикаментозного поєднання, що вказує на доцільність

використання метформіну сумісно з ноотропами для попередження або лікування когнітивних порушень, які виникають внаслідок цукрового діабету.

ВИСНОВКИ

1. Алоксан-індукована гіперглікемія, виконуючи роль амнезуючого чинника, викликає розвиток когнітивного дефіциту.

2. Метформін за умов тривалої гіперглікемії виявляє незначну ноотропну активність при короткостроковому використанні в низьких дозах, водночас не проявляючи цих властивостей при тривалому введенні.

3. При сумісному використанні з пірацетамом метформін потенціює антиамнестичні властивості пірацетаму та сприяє відновленню втрачених когнітивних функцій.

4. Метформін при комбінуванні з пірацетамом знижує вміст ранніх і пізніх маркерів деструкції білкових молекул, а також рівень стабільних метаболітів оксиду азоту в корі головного мозку.

5. Комбіноване курсове введення пірацетаму метформіном істотно обмежує прояви деструктивних змін нейронів гіпокампу, водночас покращуючи стан його мікроциркуляторного русла.

Перспективи подальших досліджень. Представлені результати досліджень є початковою ланкою визначення особливостей нейропротекції за умов хронічної гіперглікемії та

інсулінорезистентності і потребують подальшого вивчення механізмів ендотеліопroteкції при використанні гіпоглікемічних лікарських засобів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антомонов М. Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. Киев: Малий друк, 2006. 558 с.
2. Когнитивные нарушения у больных сахарным диабетом 2 типа: распространенность, патогенетические механизмы, влияние противодиабетических препаратов / О. Д. Остроумова и др. *Сахарный диабет*. 2018. Т. 21, № 4. С. 307-318. DOI: <https://doi.org/10.14341/DM9660>
3. Чернобрицев О. П., Зяблицев С. В., Панова Т. Г., Панченко Ю. О. Ендотеліальна дисфункція при цукровому діабеті 2-го типу: огляд. *Медицина наука України*. 2019. Т. 15, № 1-2. С. 80-86. DOI: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1-2.2019.12>
4. Bako H. Y., Ibrahim M. A., Isah M. S., Ibrahim S. Inhibition of JAK-STAT and NF- κ B signalling systems could be a novel therapeutic target against insulin resistance and type 2 diabetes. *Life Sci*. 2019. 15 Dec. (Vol. 239). P. 117045. Epub: 2019 Nov 12. PMID: 31730866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117045>
5. Cerebral perfusion alterations in type 2 diabetes and its relation to insulin resistance and cognitive dysfunction / Y. Cui et al *Brain Imaging Behav*. 2017. Oct. (Vol. 11, No. 5). P. 1248-1257. PMID: 27714551. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11682-016-9583-9>
6. A Comparison of Different Approaches to Quantify Nitric Oxide Release from NO-Releasing Materials in Relevant Biological Media / V. R. Pinto et al. *Molecules*. 2020. 2 Jun. (Vol. 25, No. 11). P. 2580. PMID: 32498254. PMCID: PMC7321377. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25112580>
7. Differential change in cortical and hippocampal monoamines, and behavioral patterns in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats / L. W. Lin et al. *Iran J Basic Med Sci*. 2018. Oct. (Vol. 21, No. 10). P. 1026-1034. PMID: 30524676. PMCID: PMC6281071. DOI: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.29810.7197>
8. Gambaryan S., Tsikas D. A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids*. 2015. Sep. (Vol. 47, No. 9). P. 1779-93. PMID: 25929585. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1986-1>
9. Hasanein P., Emamjomeh A., Chenarani N., Bohlooli M. Beneficial effects of rutin in diabetes-induced deficits in acquisition learning, retention memory and pain perception in rats. *Nutr Neurosci*. 2020. Jul. (Vol. 23, No. 7). P. 563-574. PMID: 30321127. DOI: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1533269>
10. Ighodaro O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018. Dec. (Vol. 108). P. 656-662. PMID: 30245465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>
11. Kuo J. Electron microscopy: Methods and protocols. New York: Humana Press; 2014. 799 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1>
12. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions / N. Apostolova et al. *Redox Biol*. 2020. Jul. (Vol. 34). P. 101517. PMID: 32535544; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>
13. Metformin improves endothelial function in aortic tissue and microvascular endothelial cells subjected to diabetic hyperglycaemic conditions / S. Ghosh et al. *Biochem Pharmacol*. 2015. 1 Dec. (Vol. 98, No. 3). P. 412-21. PMID: 26467186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.008>
14. Rena G., Hardie D. G., Pearson E. R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017. Sep. (Vol. 60, No. 9). P. 1577-1585. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
15. Vizir V. A., Makurina G. I. State of free-radical processes and antioxidant defence of patients with psoriasis and concomitant essential hypertension. *Zaporozhye Medical Journal*. 2016. Oct. (Vol. 97, No. 4). P. 21-28. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2016.4.79730>

REFERENCES

1. Antomonov MYu. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data]. Kyiv: Malyi druk; 2006. p. 558. Russian.
2. Ostroumova OD, Surkova EV, Chikh EV, Rebrova EV, Borisov MS. [Cognitive impairment in patients with type 2 diabetes mellitus: prevalence, pathogenetic mechanisms, the effect of antidiabetic drugs]. *Sakharnyi diabet*. 2018;21(4):307-18. Russian. doi: <https://doi.org/10.14341/DM9660>
3. Chernobrivtsev OP, Zyablitsev SV, Panova TI, Panchenko YuO. [Endothelial dysfunction in type 2 diabetes. Review]. *Medychna nauka Ukrainy*. 2019;15(1-2):80-86. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1-2.2019.12>
4. Bako HY, Ibrahim MA, Isah MS, Ibrahim S. Inhibition of JAK-STAT and NF- κ B signalling systems could be a novel therapeutic target against insulin resistance and type 2 diabetes. *Life Sci*. 2019 Dec 15;239:117045. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31730866. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117045>
5. Cui Y, Liang X, Gu H, Hu Y, Zhao Z, Yang XY, Qian C, Yang Y, Teng GJ. Cerebral perfusion alterations

in type 2 diabetes and its relation to insulin resistance and cognitive dysfunction. *Brain Imaging Behav.* 2017 Oct;11(5):1248-57. PMID: 27714551.

doi: <https://doi.org/10.1007/s11682-016-9583-9>

6. V Pinto R, Antunes F, Pires J, Silva-Herdade A, Pinto ML. A Comparison of Different Approaches to Quantify Nitric Oxide Release from NO-Releasing Materials in Relevant Biological Media. *Molecules.* 2020 Jun 2;25(11):2580. PMID: 32498254.

doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25112580>

7. Lin LW, Tsai FS, Yang WT, Lai SC, Shih CC, Lee SC, Wu CR. Differential change in cortical and hippocampal monoamines, and behavioral patterns in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018 Oct;21(10):1026-34. PMID: 30524676. PMCID: PMC6281071.

doi: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.29810.7197>

8. Gambaryan S, Tsikas D. A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids.* 2015 Sep;47(9):1779-93. Epub 2015 May 1. PMID: 25929585.

doi: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1986-1>

9. Hasanein P, Emamjomeh A, Chenarani N, Bohlooli M. Beneficial effects of rutin in diabetes-induced deficits in acquisition learning, retention memory and pain perception in rats. *Nutr Neurosci.* 2020 Jul;23(7):563-74. PMID: 30321127.

doi: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1533269>

10. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:656-62. PMID: 30245465. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058>

11. Kuo J. *Electron microscopy: Methods and protocols.* New York: Humana Press; 2014. p. 799. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1>

12. Apostolova N, Iannantuoni F, Gruevska A, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biol.* 2020 Jul;34:101517. Epub 2020 May 25. PMID: 32535544. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>

13. Ghosh S, Lakshmanan AP, Hwang MJ, Kubba H, Mushannen A, Triggler CR, Ding H. Metformin improves endothelial function in aortic tissue and microvascular endothelial cells subjected to diabetic hyperglycaemic conditions. *Biochem Pharmacol.* 2015 Dec 1;98(3):412-21. PMID: 26467186.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.008>

14. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017 Sep;60(9):1577-85. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086;

doi: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>

15. Vizir VA, Makurina GI. State of free-radical processes and antioxidant defence of patients with psoriasis and concomitant essential hypertension. *Zaporozhye Medical Journal.* 2016 Oct;4(97):21-28. doi: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2016.4.79730>

Стаття надійшла до редакції
23.04.2020

