

Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що застосування препарату "Мілдронат" позитивно впливає на метаболічні процеси клітин тимусу. Насамперед, застосування препарату попереджає деструктивно-дистрофічні зміни клітин у різних зонах і це переконливо свідчить про перспективність його застосування для профілактики й лікування мікромеркуріалізму.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Введення хлориду ртуті приводить до деструк-

тивно-дистрофічних змін клітин у різних морфофункціональних компартментах тимусу щурів. Найбільш виражені зміни спостерігаються за умов довготривалої інтоксикації.

2. Під впливом препарату "Мілдронат" деструктивно-дистрофічні зміни, що виникають за умов мікромеркуріалізму в різних морфофункціональних компартментах тимусу, нормалізуються.

В подальших дослідженнях буде проведено аналіз ультраструктурних змін тимусу під впливом інших фармакологічних препаратів.

Література

Літус В.І. Морфологічні зміни тимусу щурів за умов мікромеркуріалізму та використання терапії, що стимулює метаболічні процеси //Зб. наук. праць співробітників КМАПО ім.П.Л.Шупика. - К., 2007.- Вип. 16, кн.2.- С.35.

Сердюк А.М., Белицкая Э.Н., Паранько

Г.Г., Шматков Г.Г. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин.- Д.: Арт-Пресс.- 2004.- 147с.

Трахтенберг І.М., Тичинін В.А., Короленко Т.К. та ін. Експериментальне дослідження дії важких металів - ртуті, свинцю та марганцю - на розвиток

адаптаційних реакцій у щурів різних вікових груп //Тез. доп. 2 з'їзду токсикологів України.- К., 2004.- С.33.

Barbier O., Jacquillet G., Tauc M. et al. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney //Nephron Physiol.- 2005.- Vol.99, №4.- P.105-110.

ВЛИЯНИЕ МИКРОМЕРКУРИАЛИЗМА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ТИМУСА КРЫС

Литус В.И., Чайковский Ю.Б.

Резюме. Изучено влияние микромеркуриализма на ультраструктурную характеристику клеток различных морфофункциональных компартментов тимуса белых крыс до и в условиях использования препарата "Милдронат". Показано, что введение хлорида ртути приводит к деструктивно-дистрофическим изменениям клеток, что наиболее выражено в субкапсулярной зоне в условиях длительной интоксикации. Под влиянием препарата "Милдронат" изменения, возникающие в условиях микромеркуриализма в разных морфофункциональных компартментах тимуса, нормализуются.

Ключевые слова: тимус, хлорид ртути, микромеркуриализм, "Милдронат".

INFLUENCE OF MICROMERCURYALISM ON ULTRASTRUCTURE OF RATS' THYMUS CELLS

Litus V.I., Chaikovskiy Yu.B.

Summary. Influence of micromercurialism on ultrastructure of white rats' thymus cells in various morphofunctional compartments before and in conditions of "Mildronatum" use was investigated. It was shown that mercury chloride led to destructive and dystrophic changes of cells and it was more prominent in subcapsular zone in conditions of long term intoxication. Injections of "Mildronatum" resulted in normalisation of changes which occurred in various morphofunctional compartments in conditions of micromercurialism.

Key words: thymus, mercury chloride, micromercurialism, "Mildronatum".

УДК: 617.73:616.833.152-08-084:615.015

ПРОФІЛАКТИЧНО-ЛІКУВАЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВІНБОРОНУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ СІТКІВКИ

Черешнюк І.Л.

Науково-дослідний центр та кафедра фармакології ВНМУ ім.М.І.Пирогова (вул.Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

Резюме. Експериментальна ішемія та ішемія-реперфузія викликала накладанням ретробульбарної лігатури у щурів. Тривалість ішемії була основним чинником, який визначав суттєвість пошкодження сітківки. Захисний ефект вінборону при тотальній ішемії сітківки тривалістю 60-120 хв. був досліджений методом протокової цитометрії. Лікувальна ефективність при транзиторній ішемії сітківки була досліджена гістологічно. Ішемія 60 хв. призвела до суттєвого пошкодження, а 120 хв. - до незворотних пошкодженням клітин сітківки. При експериментальній ішемії у щурів вінборон проявляє як профілактичний, так і лікувальний ефект.

Ключові слова: вінборон, ретинопротекція, ішемія, апоптоз, некроз, протокова цитометрія.

Вступ

Відомо, що ішемія сітківки та зорового нерва є найбільш частим патологічним процесом, який в більшості випадків призводить до розладів функцій зору і нерідко до сліпоти [Hirooka et al., 2006]. Однак у зв'язку з відсут-

ністю достатньо ефективної терапії та профілактики цієї патології пошук нових фармакологічних засобів, які могли б покращити перебіг ішемічного процесу, залишається актуальним і в наш час [Choi et al., 2006].

Нашу увагу привернув до себе новий вітчизняний препарат вінборон, політропні властивості якого (спазмолітична, антигіпоксична, антисклеротична, антиагрегантна, здатність покращувати мозковий кровообіг та мікроциркуляцію, протинабрякова, імунотулююча, антиоксидантна) [Степанюк та ін., 2007] добре вписуються в патогенез ішемічних захворювань заднього відділу ока і могли б позитивно вплинути на майже усі відомі нам ланки їх патогенезу. Саме це і спонукало нас до проведення даного експериментального дослідження.

Мета дослідження: оцінити ефективність профілактичної (ретинопротекторної) дії вінборону за показниками рівнів апоптозу та некрозу клітин сітківки методом лазерної протокової цитометрії, а також його лікувальну ефективність при ішемії та реперфузії ока.

Матеріали та методи

Експерименти були проведені на 32 щурах обох статей популяції Вістар із масою близько 200 г., які утримувалися в стандартних умовах віварію. Тотальну ішемію ока викликали шляхом накладання ретробульбарної лігатури на зоровий нерв та судини [Roth et al., 1998] на тлі внутрішньочеревинного кетамінового наркозу.

Тварин було розподілено на дві серії. У першій серії (16 тварин) оцінювалась ефективність профілактичної (ретинопротекторної) дії вінборону за показниками рівнів апоптозу та некрозу клітин сітківки методом лазерної протокової цитометрії, який широко використовується в сучасній експериментальній і клінічній медицині [Carmody et al., 1998; Givan, 2001; McCoy, 2001]. У другій серії (16 тварин) гістоморфологічно оцінювалась лікувально-профілактична ефективність вінборону при ішемії та реперфузії ока.

Основну групу першої серії склали 8 тварин, яким за 1 год. до накладання лігатури одноразово внутрішньочеревинно вводили вінборон у дозі 1 мг/кг маси тіла. Контрольна група першої серії, до створення ішемії ока, отримувала еквівалентну кількість 0,9% розчину NaCl.

Після енуклеацій, мікрохірургічного видалення сітківки, готували суспензії клітин у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) з рН=7,4 за методом [Wilson, 2000]. Отриману суспензію клітин фільтрували через фільтр Filcons 50 мкм і відмивали в 1,5 мл ФСБ центрифугуванням (300g 5 хв). Після видалення супернатанта й додавання до осаду ФСБ проводили інкубацію отриманої суспензії клітин Annexin V-FITC (1 мкл) та Propidium Iodide (2,5 мкл) відповідно до протоколу-інструкції використання "APOPTEST™ -FITC" (Dako, Нідерланди). На ранній стадії апоптозу цілісність клітинної мембрани зберігається, однак відбувається перебудова її фосфоліпидних компонентів і на поверхні клітини з'являється фосфатидилсерин. Аннексин V-FITC здатний з'єднуватися з фосфатидилсерином у присутності кальцію і маркувати апоптозні клітини. Пропидія йодид проникає тільки через пошкоджену мембрану клітин і маркує не-

кротизовані клітини [Castedo et al, 2007].

Цитофлюорометрію проводили на лазерному проточному цитофлюориметрі (аргон, 488 нм) "PAS" (Partec, Німеччина) із наступним аналізом за допомогою програмного забезпечення для аналізу великих масивів даних FloMax. Враховували дані, отримані по прямому (FSC) та боковому (SSC) світлорозсіюванню, а також по флюоресценції клітин на першому (FL1) і другому (FL2) фотопримножувачах. Компенсація накладання флюоресценції здійснювалась засобами програмного забезпечення. Після отримання гістограм для відокремлення від фонових шумів, уламків клітин та ін. мікрочастинок формували зону інтересу - гейт R1, який і підлягав безпосередньо аналізу. Протоковий аналіз суспензій клітин сітківки усіх груп проводили через 60 та 120 хв після моделювання патологічного стану. Результати досліджень підлягали статистичній обробці.

Основну групу другої серії склали 8 тварин, яким відразу після зняття ретробульбарної лігатури (реперфузія) одноразово внутрішньочеревинно вводили вінборон у дозі 1 мг/кг маси тіла. Виведення тварин з експерименту та енуклеації виконували через 24 год. після реперфузії. Саме в цей термін після змодельованої ішемії-реперфузії ока спостерігаються виражені патогістоморфологічні зміни у всіх шарах сітківки [Hangai et al, 1995]. Контрольна група другої серії, після реперфузії, отримувала еквівалентну кількість 0,9% розчину NaCl.

Енуклеювані очі щурів другої серії після промивання в проточній воді, видалення рогівки, райдужки, кришталіка та цилиарного тіла фіксувались в розчині Девідсона і поміщались в блоки з парапластом. Парапластові зрізи (5 мкм) отримували за допомогою ротаційного мікротома, після чого виконувалось їх фарбування гематоксилін-еозином за стандартним протоколом.

Результати. Обговорення

Встановлено, що через 60 хв. після створення ішемії 52,28±3,94% клітин сітківки перебувають у некротичному стані, а 9,06±1,50% - у стані апоптозу. Через 120 хвилин після створення ішемії реєструється майже повна загибель клітин сітківки 95,12±1,20%. При дослідженні рівнів апоптозу та некрозу в суспензіях клітин сітківки щурів, які попередньо отримували вінборон, через 60 хвилин після моделювання патологічного стану відмічаються вірогідно нижчі (p<0,05) рівні апоптоз-

Таблиця 1. Вплив вінборону на динаміку апоптозу та некрозу клітин сітківки в умовах тотальної ішемії ока у щурів (%), M±m, n=8).

Групи тварин	60 хв. ішемії		120 хв. ішемії	
	Некроз	Апоптоз	Некроз	Апоптоз
Контроль	52,28±3,94	9,06±1,50	95,12±1,20	1,28±0,21
Вінборон	30,51±3,03*	3,58±0,64*	93,62±1,80	1,51±0,10

Примітка: * - p<0,05 при порівнянні з групою контролю.

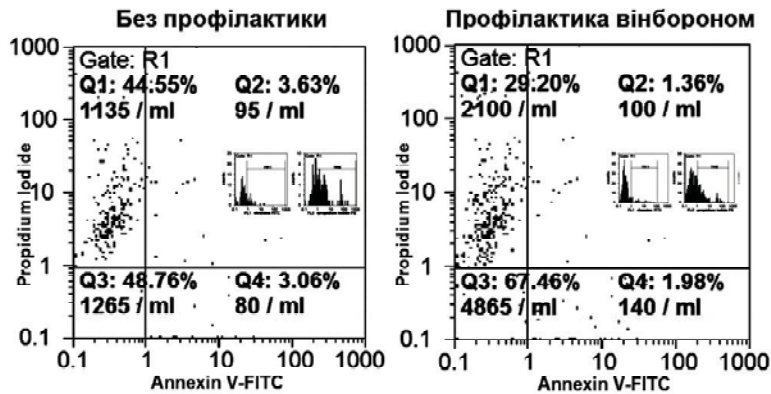


Рис. 1. Експресія аннексина та пропидія йодиду клітинами сітківки через 60 хв. після створення ішемії (Q1 - некроз, Q4 -ранній апоптоз).

них ($3,58 \pm 0,64\%$) і, особливо, некротизованих ($30,51 \pm 3,03\%$) клітин у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи, однак на 120 хв. від початку ішемізації ока на тлі вінборону, аналогічно контрольній групі, реєструвалась їх майже повна некротична загибель $93,62 \pm 1,80\%$ (рис. 1, табл. 1).

Таким чином, отримані нами дані щодо виживання клітин сітківки методом протокової цитометрії узгоджуються з результатами, отриманими іншими дослідниками іншими методами: часткове відновлення функції сітківки за допомогою лікувальних заходів можливе в межах годинної ішемії і різко знижується в період 60 - 120 хв., а в термін через 2 год. це явище практично неможливе [Hayreh, Weingeist, 1980, Sell?s-Navarro et al., 1996]. Профілактичне введення вінборону в заданих умовах експерименту проявляється ретинопротекторною дією, про що свідчить зменшення рівнів апоптозу та некрозу клітин в задньому відділі ока, можливо за рахунок політропних властивостей препарату.

При гістологічному вивченні експериментального матеріалу через 24 год. після створення нами патології у тварин контрольної групи пошкодження сітківки реєстру-

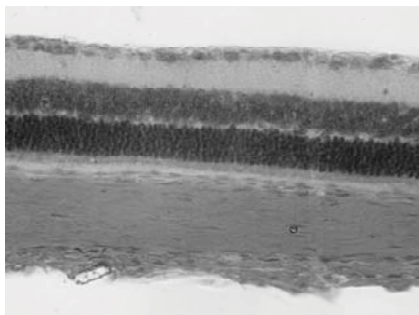


Рис. 2. Нормальна сітківка щура. Гематоксилін-еозин. х200.

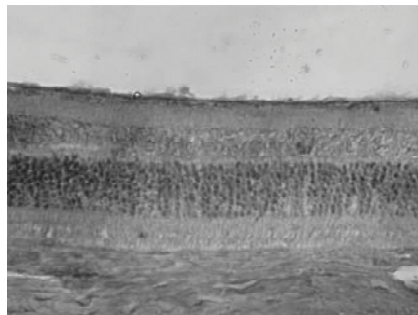


Рис. 3. Сітківка щура після ішемії 60 хв. Набряк фоторецепторного й внутрішнього ядерного шару, розрідження зовнішнього ядерного шару, депопуляція гангліонарного шару, зменшення товщини внутрішнього сітчастого шару. Гематоксилін-еозин. х300.

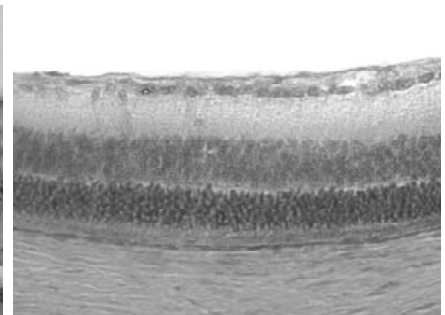


Рис. 4. Сітківка щура після ішемії 60 хв і лікування вінбороном. Добра збереженість усіх шарів стіківки, деяка розрідженість внутрішнього й зовнішнього ядерного шару. Гематоксилін-еозин. х300.

валось у внутрішньому ядерному шарі, внутрішньому сітчастому шарі, гангліонарному шарі та шарі нервових волокон. Ліпше виглядав зовнішній ядерний шар. Набряк спостерігався в шарі нервових волокон, гангліонарному і внутрішньому плексиформному шарах і менш помітний у внутрішньому ядерному й зовнішньому ядерному шарах. Велика кількість клітин внутрішнього ядерного шару й особливо більшість клітин гангліонарного шару були пошкоджені. Таким чином, в результаті створення нами ішемії в основному пошкоджуються найважливіші для виконання функції зору - внутрішні структури сітківки (рис. 3).

Слід відмітити, що у тварин обох експериментальних груп в усіх шарах сітківки виявлено зміни, що виникли внаслідок ішемії. Так, у тварин контрольної групи відмічалось зменшення щільності в фоторецепторному, зовнішньому та внутрішньому ядерних шарах. Особливо постраждав шар гангліонарних нервових клітин, який місцями практично не містив збережених нейронів, вкрай рідко виявляються поодинокі групи з набухлими ектопованими набряклими або пікнотизованими ядрами з явищами хроматолізу і перичеллюлярної інкрустації, оточені зернами розпаду їхньої цитоплазми внаслідок важкої ішемії. Патологічні гістоморфологічні зміни в сітківках контрольних тварин співпадають із такими, які були отримані на даній моделі патології й іншими дослідниками [Hangai, 1995], що вказує на коректність та стандартність використаної нами моделі транзиторної ішемії ока.

У тварин, які після створення ішемії отримували лікування вінбороном, також спостерігалось деяке зменшення щільності внутрішнього ядерного шару, однак структура зовнішнього ядерного шару та шару фоторецепторів практично не відрізнялась від норми. Водночас в збереженому стані візуалізувався і шар ганг-

ліонарних клітин, хоча кількість нервових клітин у ньому була вочевидь меншою, ніж у нормі, що пояснюється його надзвичайною чутливістю до ішемії (рис. 4).

Таким чином, експериментальна ішемія-реперфузія ока без фармакологічної корекції викликає ушкодження у всіх шарах сітківки - фоторецепторному, зовнішньому та внутрішньому ядерних шарах, внутрішньому плексиформному шарі і, особливо, в гангліонарному. В протилежність цьому, на тлі лікування вінбороном виявлений суттєвий позитивний ефект корекції наслідків ішемії-реперфузії.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Профілактичне внутрішньочеревинне введення

вінборону (1 мг/кг) в умовах експериментальної ішемії ока проявляється ретинопротекторною дією, про що свідчить зменшення рівнів апоптозу та некрозу клітин у задньому відділі ока.

2. Лікувальне внутрішньочеревинне призначення вінборону в дозі (1 мг/кг) при експериментальній тотальній ішемії-реперфузії ока в сітківці усіх щурів забезпечує захист від патогенного впливу ішемії та оксидативного стресу від реперфузії усі досліджувані клітинні структури сітківки та, особливо, найбільш чутливий до пошкодження гангліонарний шар.

Таким чином, в подальшому перспективним та цільним буде клінічне застосування препарату в якості протиішемічного засобу при дистрофічній патології органа зору.

Література

- Степанюк Г.І., Пентюк О.О., Піскун Р.П. Вінборон - лікарський засіб з політропними фармакологічними ефектами.- Вінниця: Континент-Прим, 2007.- 248с.
- Basic principles in clinical flow cytometry / D.F.Keren, J.P.McCoy, J.L.Carey et al.- Flow Cytometry in Clinical Diagnosis. 3rd ed.- Chicago, IL: ASCP Press, 2001.- P.31-64.
- Carmody R.J., McGowan A.J., Cotter T.G. Rapid detection of rod photoreceptor apoptosis by flow cytometry // Cytometry.- 1998.- Vol.33, №1.- P.89-92.
- Inhibition of nNOS and COX-2 expression by lutein in acute retinal ischemia / J.S.Choi, D.Kim, Y.M.Hong et al. // Nutrition.- 2006.- Vol.22, №6.- P.668-671.
- Influence of hypothermia on right atrial cardiomyocyte apoptosis in patients undergoing aortic valve replacement / E.Castedo, R.Castelj?n, E.Monguioet al. //J. Cardiothorac Surg.- 2007.- Vol.2.- P.1-7.
- Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat /M.Hangai, N.Yoshimura, M.Yoshida et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1995.- Vol.36.- P.571-578.
- Givan A.L. Flow Cytometry: First Principles.- New York, NY: Wiley-Liss, 2001.- 256 pp.
- Hayreh S.S., Weingeist T.A. Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia //Br. J. Ophthalmol.- 1980.- Vol.64, №11.- P.818-825.
- Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury / K.Hirooka, O.Miyamoto, P.Jinming et al. //Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2006.- Vol.47, №4.- P.1653-1657.
- Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. /S.Roth, B.Li, P.S.Rosenbaum et al. //Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1998.- Vol.39, №5.- P.777-785.
- Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study /I.Sell?s-Navarro, V.M.Pillegas-P?rez, M.Salvador-Silva et al. //Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1996.- Vol.37.- №10.- P.2002-2014.
- Wilson G.D. Mechanical disaggregation of solid tumours //Flow Cytometry: a practical approach /Ed. by Ormerod M.I.- 3rd ed.- Oxford University Press, 2000.- P.44.

ПРОФИЛАКТИЧЕСКИ-ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИНБОРОНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ СЕТЧАТКИ

Черешнюк И.Л.

Резюме. Экспериментальная ишемия и ишемия-реперфузия сетчатки была вызвана наложением ретробульбарной лигатуры у крыс. Продолжительность ишемии была основным фактором, определяющим серьезность повреждения сетчатки. Защитный эффект винборона при тотальной ишемии сетчатки продолжительностью 60-120 мин был исследован методом проточной цитометрии. Лечебная эффективность при транзиторной ишемии сетчатки исследована гистологически. Ишемия 60 мин. привела к существенному повреждению, а 120 мин - к необратимым повреждениям клеток сетчатки. При экспериментальной ишемии сетчаток у крыс винборон проявляет как профилактический, так и лечебный эффект.

Ключевые слова: винборон, ретинопротекция, ишемия, апоптоз, некроз, проточная цитометрия.

PROPHYLACTIC AND TREATMENT OF VINBORON IN CASE OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE RETINA

Chereshnyuk I.L.

Summary. The experimental ischemia and ischemia-reperfusion of the retina was induced by retrobulbar ligations in eyes of rats. Duration of the ischaemia was the principal factor determining severity of damage. Protective effect of vinboron at total ischaemia, lasting from 60 to 120 min, was studied by flow cytometry on the retinal cells. Treatment effect of total transient ischemia was studied by histology. Ischemia for to 60 minutes produced significant retinal cells damage and ischemia for to 120 minutes produced irreversible retinal damage. The vinboron protected rats' retinal cells from ischemic cell damages when administered before the onset of ischemia and after transient ischemia.

Key words: vinboron, retinoprotection, ischemia, apoptosis, necrosis, flow cytometry.