

© Черешнюк І.Л., Загорій Г.В., Ходаківський О.А.

УДК: 615.217:617.735:617.731:616.133.321-005.7

Черешнюк І.Л.¹, Загорій Г.В.², Ходаківський О.А.¹

¹Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018);

²Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112)

НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКТОРНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕКСИДОЛУ В УМОВАХ ПЕРЕХІДНОЇ ІШЕМІЇ ОКА

Резюме. В умовах модельної 60 хвилинної тотальної ішемії-реперфузії ока у щурів встановлено спроможність мексидолу (100 мг/кг внутрішньоочеревинно) послаблювати деструкцію мембран нейронів сітківки, що проявилось у зменшенні в сироватці крові активності та рівня маркерів порушення мембранної цілісності нейронів сітківки - нейрон-специфічної енолази та білка S 100. Отримані результати вказують на наявність у досліджуваного препарату нейроцитопротекторних властивостей, що є підґрунтям до збереження структурно-функціональної цілісності сітківки в умовах модельної патології. Наведені дані обґрунтовують доцільність використання мексидолу в якості референсного препарату при доклінічній оцінці нейроретинотекторних властивостей біологічно-активних сполук.

Ключові слова: мексидол, нейроретинотекція, сітківка, ішемія-реперфузія ока.

Вступ

Переважає більшість судинних захворювань ока (артеріальні або венозні оклюзії судин сітківки, глаукома (особливо гострий напад), діабетична ретинопатія, ретинопатії недоношених, ішемічні оптичні нейропатії та ін.) асоціюються з ішемічно-реперфузійним (ІР) ушкодженням сітківки та зорового нерва [Osborne et al., 2004]. Поява на вітчизняному фармацевтичному ринку значної кількості нових метаболітотропних лікарських засобів із цитопротекторним впливом на нейрони (цитиколін, кортексин, корвітин, тіотриазолін, мексидол та ін. похідні янтарної кислоти) дає змогу сподіватись на їх ефективність не тільки в умовах церебральної недостатності, а й при ішемічно-гіпоксичному ураженні сітківки.

Мета: охарактеризувати наявність та оцінити величину нейроретинотекторних властивостей мексидолу за маркерами нейродеструкції після ішемії-реперфузії ока.

Матеріали та методи

Оцінку ретинопротекторних властивостей мексидолу ("Мексидол", НВК Фармасофт, Росія), проведено на 35 щурах-самцях лінії Вістар масою 160-180 г. Усі тварини знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (ВНМУ) на стандартному водно-харчовому раціоні при природному освітленні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались методичних рекомендацій державного фармацевтичного центру Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України і вимог біоетики згідно до Національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (2001), що відповідають положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" [Simone, Serratos, 2005]. Дослідження проводили у науково-дослідній лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ імені М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №003/10 від

11 січня 2010 р.) та на базі клініко-діагностичної лабораторії кафедри біохімії (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.)

Для відтворення модельної ішемії сітківки використовували модель однобічної ІР ока у щурів, шляхом накладання та подальшого затягування лігатур до зникнення кровотоку в судинах сітківки (термін експозиції 1 год). Через 60 хв. після ішемії, ретробульбарні лігатури обережно розпускали і знімали - кровообіг у судинах ока відновлювався самостійно. Стан судин очного дна контролювали за допомогою прямої офтальмоскопії (попередньо наносили на рогівку гель) через покривне скло [Minhas et al., 2012].

В умовах модельної ІР мексидол вводили в лікувальному режимі внутрішньоочеревинно (в/о) дозою 100 мг/кг, яка забезпечує максимальну реалізацію його нейропротекторних, протигіпоксичних та антиоксидантних властивостей [Ходаківський, 2014]. Терапію розпочинали через 30 хв. після накладання ретробульбарної лігатури з наступним введенням досліджуваних речовин з інтервалом 12 год (двічі на добу). Група контрольної патології (тварини з ІР) отримувала 0,9% розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о. Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, офтальмоскопія, накладання лігатури) за виключенням затягування ретробульбарної лігатури.

Про активацію нейроретинотекторних процесів після експериментальної ІР ока судили за рівнем нейромаркерів (нейронспецифічна енолаза (NSE) і білок S 100). Моніторинг NSE проводили в кінці першої доби, а визначення вмісту білка S 100 - сьомої доби експерименту відповідно. Вивільнення NSE з нейронів сітківки у кров свідчить про пошкодження їх мембранної цілісності, а рівень білка S 100 віддзеркалює інтенсивність поділу нейроглії. Зростання досліджуваних показників корелює із ступенем нейродеструкції [Anand, Stead, 2005; Chen et al., 2005]. Активність NSE та вміст білка S 100 у сироватці крові щурів вимірювали методом твердофазного імуноферментного ана-

лізу з використанням наборів NSE ELISA KIT (DAI, США) та S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) на приладі фірми "Hipson" (Чехія) [Ходаківський, 2014].

Травматичні маніпуляції (накладання лігатур) та етаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг в/о) [Ходаківський, 2014] ("Fresenius Kabi", Австрія).

Результати обробляли за допомогою статистичної програми StatPlus 2009. Використовували непараметричний критерій W Уайта, парний критерій $\bar{K}$ Вілкоксона для визначення значущих змін у динаміці в сердині групи.

Результати. Обговорення

Як показали результати наших досліджень, у групі контрольної патології через добу після IP ока, активність NSE була вірогідно вищою за аналогічний показник у псевдооперованих щурів в середньому в 8,88 рази ($p < 0,01$), що вказує на значну деструкцію нейрональних шарів сітківки в умовах даного патологічного стану (табл. 1).

Подібна гіперактивація NSE, опосередковано вказує на той факт, що IP ока, супроводжується розвитком некротичних процесів у нейрональних шарах сітківки. Це призводить до порушення мембранної цілісності нейроцитів і виходу енолази за межі клітин, звідки вона потрапляє в судинне русло.

Терапевтичне застосування мексидолу впродовж першої доби експерименту сприяло вірогідному ($p < 0,01$) зниженню відносно тварин контрольної патології активності досліджуваного маркера в середньому в 1,5 разу. Подібні зміни на тлі лікувального введення мексидолу в постреканалізаційний період, свідчать про послаблення деструкції в нейрональних шарах сітківки та вказують на наявність у досліджуваного препарату нейропротекторних властивостей при даній патології. Таким чином, мексидол завдяки реалізації своїх нейропротекторних програм при модельній IP ока, сприяє збереженню мембранної цілісності нейроцитів сітківки.

Як свідчать літературні дані [Chen et al., 2005], на відміну від NSE, яка є внутрішньонейрональним ферментом, і підвищення її активності безпосередньо вказує на пошкодження цілісності мембран нейроцитів, білок S 100 являє собою специфічний пептид астроцитарної глії, а зростання його рівня відображає запальну реакцію в гліальній тканині та вказує на інтенсивний поділ клітин нейроглії. Зазначені процеси характеризують етап організації ішемічного вогнища і заміщення нейрогліальними клітинами тих нейроцитів, які загинули некротичним шляхом. Розвиток запальної реакції в сітківці тканині є прямим наслідком некрозу нейронів у вогнищі ішемії і фактором, що підтримує вторинне пошкодження нервових клітин [Anand, Stead, 2005].

Моніторинг рівня білка S 100 на 7 добу експери-

Таблиця 1. Вплив внутрішньоочеревинного терапевтичного ведення мексидолу (100 мг/кг) на активність нейрон-специфічної енолази в крові щурів через 24 год після модельної ішемії-реперфузії ока ($M \pm m$, $n=7$).

Дослідні групи	Рівень активності NSE (нг/мл)
Псевдооперовані щури	$0,357 \pm 0,022$
IP + 0,9% р-н NaCl (контрольна патологія)	$3,169 \pm 0,168^*$
IP + мексидол	$2,118 \pm 0,012^{* \#}$

Примітки: NSE - нейрон-специфічна енолаза; IP - ішемія-реперфузія; * - $p < 0,01$ відносно показника псевдооперованих щурів; # - $p < 0,01$ відносно показника контрольної патології.

Таблиця 2. Вплив семиденного терапевтичного ведення мексидолу (100 мг/кг) щурам із модельною ішемією-реперфузією ока на рівень білка S 100 ($M \pm m$, $n=7$).

Дослідні групи	Рівень білка S 100 (нг/мл)
Псевдооперовані щури	$0,441 \pm 0,031$
IP + 0,9% р-н NaCl (контрольна патологія)	$12,861 \pm 0,116^*$
IP + мексидол	$4,956 \pm 0,098^{* \#}$

Примітки: IP - ішемія-реперфузія; * - $p < 0,01$ відносно показника псевдооперованих щурів; # - $p < 0,01$ відносно показника контрольної патології.

менту свідчить про його вірогідне зростання у щурів контрольної патології відносно псевдооперованих тварин в середньому в 29,16 разу (табл. 2). Таким чином аналіз отриманих даних вказує на те, що наприкінці першого тижня постреперфузійного періоду, в сітківці відбувається активний поділ клітин нейроглії та розвиток запальної реакції в гліальній тканині. Причому ці процеси мають прямий зв'язок із інтенсивністю нейронекрозу у першу добу відновленого кровообігу.

Лікувальне семиденне введення щурам з ішемією-реперфузією ока мексидолу (100 мг/кг) сприяло достовірному ($p < 0,01$) зменшенню рівня білка S 100 відносно тварин контрольної патології в середньому у 2,6 разу, що свідчить про меншу, ніж у контролі активацію нейроглії.

На нашу думку, в основі захисного ефекту мексидолу в умовах даного патологічного стану можуть лежати механізми тотожні з такими, що мають місце при реалізації його церебропротекторних властивостей (антигіпоксична та антиоксидантна дія, ендотеліопротекторні властивості, покращення мікроциркуляції).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Таким чином, дослідження впливу ампульного розчину мексидолу ("Мексидол", НВК Фармасофт, Росія) на деструкцію мембран нейронів сітківки щурів на моделі IP ока за активністю нейрон-специфічної енолази та рівнем білка S 100, показало наявність у препарату нейроцитопротекторних властивостей, що є підґрунтям до збереження структурно-функціональної цілісності сітківки.

Отримані дані обґрунтовують доцільність клінічних випробовувань його ефективності в умовах ішемічно-гіпоксичного ураження зорового аналізатора. Мек-

сидол може використовуватись в якості референсного препарату при доклінічній оцінці нейроретинопротекторних властивостей біологічно-активних сполук.

Список літератури

- Ходаківський О. А. Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда (експериментальне дослідження) : автореф. дис. д. мед. н. : спец. 14.03.05 - фармакологія / О. А. Ходаківський. - Одеса., 2014. - 24с.
- Anand N. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review / N. Anand, L. G. Stead // Cerebrovasc. Dis. - 2005. - Vol.20, №4. - P.213-219.
- Chen D. Q. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury / D. Q. Chen, L. L. Zhu // Chin. J. Traumatol. - 2005. - Vol. 8, № 4. - P. 245-248.
- Minhas G. Preclinical Models to Investigate Retinal Ischemia: Advances and Drawbacks / G. Minhas, R. Morishita, A. Anand // J. Front Neurol. - 2012. - Vol. 75, № 3. - P. 1-6.
- Optic nerve and neuroprotection strategies / N. N. Osborne, G. Chidlow, C. J. Layton [et al.] // Eye. - 2004. - Vol. 18, № 11. - P. 1075-84.
- Simone F. Biotechnology, animal health and animal welfare within the framework of European Union legislation / F. Simone; J. Serratos // Rev. Sci. Tech. Oie. - 2005. - Vol. 24, № 1 - P. 89-99.

Черешнюк І.Л., Загорий Г.В., Ходаковский А.А.

НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА МЕКСИДОЛА В УСЛОВИЯХ ПЕРЕХОДЯЩЕЙ ИШЕМИИ ГЛАЗА

Резюме. В условиях модельной 60 минутной тотальной ишемии-реперфузии глаза у крыс, установлена способность мексидола (100 мг/кг внутривенно) ослаблять деструкцию мембран нейронов сетчатки, что проявилось стабилизацией в сыворотке крови маркеров, которые отражают их целостность - активность нейрон-специфической енолазы и уровень белка S 100. Полученные результаты указывают на наличие у исследуемого препарата нейроретинопротекторных свойств, что является основой для сохранения структурно-функциональной целостности сетчатки в условиях модельной патологии. Приведенные данные обосновывают целесообразность использования мексидола в качестве референсного препарата при доклинической оценки нейроретинопротекторных свойств биологически активных соединений.

Ключевые слова: мексидол, нейроретинопротекция, сетчатка, ишемия-реперфузия глаза.

Chereshnyuk I.L., Zagoriy G.V., Khodakovskiy O. A.

NEURORETINOPROTECTIVE EFFECTS OF MEXIDOL IN CONDITIONS OF TEMPORARY ISCHEMIA OF THE EYE

Summary. In experimental conditions (60 minutes of total ischemia-reperfusion in rats' eyes) was found mexidol ability (100 mg/kg intraperitoneally) to weaken the destruction of membranes of retinal neurons, which showed stabilization of serum markers that reflect the integrity of the membranes of neurons of the retina - the activity of neuron-specific enolase and level protein S 100. These results indicate the existence of the study drug neuroprotective activity, which is the basis for the preservation of the structural and functional integrity of the retina in a model of pathology. These data substantiate the feasibility of using mexidol as a reference drug in preclinical evaluation neuroprotective activity of biologically active compounds.

Key words: Mexidol, neuroprotective effect, retina, ischemia-reperfusion of the eye.

Стаття надійшла до редакції 22.09.2014р.

Черешнюк Ігор Леонідович - к. мед.н., ст.н.с. науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ імені М. І. Пирогова, лікар-офтальмолог вищої категорії; +38 068 210-21-01; vin19@yandex.ru

Загорий Гліб Володимирович - д.фарм.н., проф. кафедри організації та економіки фармації НМАПО імені П.Л. Шупика; +38 098 791-05-33; aleksey.hodakovskiy@bk.ru

Ходаківський Олексій Анатолійович - д. мед. н., доцент кафедри фармакології ВНМУ імені М. І. Пирогова; +38 098 791-05-33; aleksey.hodakovskiy@bk.ru