

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОВХ ВЯЧЕСЛАВ ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 615.216.8:617.7-001.3-005.4

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЛЬ МОДУЛЯТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ В МЕХАНІЗМАХ
НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКЦІЇ ЗА ІШЕМІЧНОГО ТА
ТРАВМАТИЧНОГО УРАЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА
(експериментальне дослідження)

14.01.32 – медична біохімія

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів
мають посилання на відповідне джерело

_____ В.Л. Повх

Науковий керівник – **Ходаківський Олексій Анатолійович**,
доктор медичних наук, професор

Вінниця – 2018

АНОТАЦІЯ

Повх В.Л. Роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктор філософії) за спеціальністю 14.01.32 «Медична біохімія» (22 – охорона здоров'я). – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2018.

Дисертаційна робота присвячена встановленню ролі модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження ока та експериментальному обґрунтуванню нових підходів до корекції патології зорового аналізатора.

Досліди проведені на 272 білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою 160-190 г та 156 кролях-самцях породи Шиншила масою 3,0-3,9 кг. Під час роботи з тваринами дотримані біоетичні норми, що засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Відтворені моделі ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів (шляхом створення одnobічної ішемії-реперфузії в басейні а. ophthalmica) та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів (шляхом контузії ока потоком вуглекислого газу під тиском). Встановлено, що експериментальне ішемічне ураження зорового аналізатору у щурів асоціюється з підвищенням маркерів нейродеструкції в сироватці крові - NSE (на 1-шу та 7-му в 11,0 та 4,3 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (на 1-шу та 7-му добу - в 8,4 та 14,7 рази, $p < 0,001$). Травматичне ураження зорового аналізатора у кролів характеризується більш значущою ескалацією сироваткових рівнів NSE у вказані терміни (в 43,4 та 42,3 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (в 20,5 та 38,8 рази, $p < 0,001$) відносно інтактних тварин. За ішемічного та травматичного ураження зорового

аналізатора введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало дозозалежне зниження рівнів NSE (в 2-6 рази, $p < 0,05$) та білка S100 (в 2-3 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату в дозі 5 мг/кг в/в, мемантину в дозі 20 мг/кг в/шл, магнію сульфату в дозі 250 мг/кг в/в.

Ішемічне ураження зорового аналізатору асоціюється з підвищенням рівня цитометричних маркерів апоптозу (клітин у фазі SUB-G0G1) та нейрогліопроліферативної активності (клітин у фазі S) в 20,2 та 7,1 рази ($p < 0,001$) на 1-шу добу, в 14,8 та 6,0 рази ($p < 0,001$) на 7-му добу, відповідно. При травматичному ураженні зорового аналізатора у кролів частки клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 та у фазі S були вищими в 14,6 та 4,41 разу станом на 1-шу добу; в 10,0 та 7,70 разів - на 7-му добу ($p < 0,001$). За ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало зниження часток клітин у фазі SUB-G0G1 (в 1,6-2,6 рази) та фазі S (в 1,5-3,0 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази, $p < 0,05$) мікроциркуляторні порушення за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору із максимальним ефектом у амантадину сульфату (5 мг/кг в/в).

Ішемічне ураження зорового аналізатора у щурів характеризується зниженням рівня АТФ (в 2,6 рази, $p < 0,001$), підвищенням рівнів МДА, карбонільних груп протеїнів, нітратів та нітритів, глутамату (в 2,4-2,7 рази, $p < 0,001$), зниженням активності глутатіонпероксидази (в 2,4 рази, $p < 0,001$) станом на 1-шу добу із достовірною, але слабкою деескалацією вказаних змін (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) на 7-му добу після відновлення кровообігу. За травматичного ураження зорового аналізатора виявляється енергодефіцит, ознаки оксидативного та нітрозативного стресу, підвищення рівня глутамату в сітківці станом на 1-шу добу із поглибленням (в 1,3-1,5 рази, $p < 0,05$) всіх виявлених порушень станом на 7-му добу. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів зменшує метаболічні порушення в сітківці ока за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора, при цьому амантадину

сульфату (5 мг/кг в/в) перевершує мемантин (20 мг/кг в/шл) в 1,2-1,5 рази ($p < 0,05$) за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків, відновлювати антиоксиданту активність глутатіонпероксидази. Амантадину сульфат зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівень метаболітів NO та зменшувати рівень глутамату в сітківці ока за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора у тварин.

За ішемічного ушкодження зорового аналізатора найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці ($r = 0,72$, $p < 0,05$), в той час як зв'язок з іншими метаболічними маркерами був середньої сили ($r = |0,45-0,62|$, $p < 0,05$). За травматичного ушкодження зорового аналізатору, навпаки, найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та вмістом АТФ ($r = -0,70$), маркерами оксидативного та нітрозативного стресу в сітківці ($r = 0,66-0,78$, $p < 0,05$), а з рівнем глутамату зв'язок був середньої сили ($r = 0,56$, $p < 0,05$). Білок S100 найбільш сильно корелює з рівнем глутамату, карбонільних груп протеїнів, активністю глутатіонпероксидази ($r = |0,56-0,68|$, $p < 0,05$) як за ішемічного, так і за травматичного ураження зорового аналізатора. За дії модуляторів NMDA-рецепторів асоціації між маркерами нейроретинодеструкції та метаболічними змінами в сітківці ока зменшуються за силою та втрачають статистичну значущість.

Таким чином, визначена роль модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ураження зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу. Вперше обґрунтована доцільність корекції нейроретинодеструктивних змін за ішемії/реперфузії ока та контузійної травми ока за допомогою інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату та інгібітора фенциклідинового сайту мемантину, засвідчена менша ефективність блокатору іонного каналу магнію сульфату. Встановлено, що за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора нейроретинопротекторний ефект інгібіторів NMDA-рецепторів

реалізується не лише через модуляцію глутаматної ексайтотоксичності, а й через зменшення в сітківці ока мікроциркуляторних розладів, зниження рівня прозапальних та проапоптичних чинників, підвищення активності глутатіонпероксидази в сітківці. Вперше засвідчено, що амантадину сульфат значуще перевершує мемантин за здатністю акселерувати деескалацію рівня NSE та білка S100 в крові, коригувати показники клітинного циклу (зі зниженням рівня фрагментації ДНК) та за метаботропним ефектом.

Практичне значення одержаних результатів полягає в обґрунтуванні доцільності використання фармакологічних модюляторів NMDA-рецепторів (амантадину, мемантину, магнію сульфату) за новим призначенням, а саме з метою диференційованої нейроретинопротективної терапії при ураженні зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу. Розширені теоретичні уявлення про роль NSE та білка S100 в механізмах глутаматної ексайтотоксичності за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора. Встановлені особливості реалізації нейроретинопротективної дії модюляторів різних сайтів NMDA-рецепторів, що дають змогу проводити цілеспрямовану розробку нових лікарських засобів - інгібіторів поліамінового сайту.

Ключові слова: ішемія ока, контузія зорового аналізатора, нейроретинопротекція, NMDA-рецептори, амантадину сульфат, мемантин, магнію сульфат.

ANNOTATION

Povkh V.L. The role of NNDA-receptor modulators in the mechanisms of neuroretinoprotection in ischemic and traumatic injuries of a visual analyzer (experimental research).

The dissertation for scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 14.01.32 «Medical biochemistry» (22 Healthcare). - National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2018.

The dissertation is devoted to the establishment of the role of NMDA-receptor modulators in the mechanisms of neuroretinoprotection for the ischemic and traumatic lesion of the eye and to the experimental substantiation of new approaches to the correction of the pathology of the visual analyzer.

Experiments were carried out on 272 white laboratory male rats of the Wistar line weighing 160-190 g and 156 the Chinchilla male rabbits weighing 3.0-3.9 kg. During the work with the animals, bioethical norms were certified by VNMU Bioethics Commission. Reproduced models of the ischemic lesions of the visual analyzer in rats (by the creation of the one-sided ischemia-reperfusion in the basin of a. ophthalmica) and traumatic damage to the visual analyzer in rabbits (contusion of the eye in rabbits was caused, by the action of carbon dioxide under pressure). It was established that the experimental ischemic lesions of the visual analyzer in rats were associated with increased markers of the degeneration of neurons in ganglionic layers of retina (neuronecrosis) in the blood serum - NSE (on 1 and 7 in 11.0 and 4.3 times, $p < 0.001$) and S100 protein (on the 1st and the 7th day - in 8.4 and 14.7 times, $p < 0,001$). Traumatic injury to the visual analyzer in rabbits is characterized by the more significant increase of NSE levels in the blood serum at the indicated time (43.4 and 42.3 times, $p < 0.001$) and S100 protein (20.5 and 38.8 times, $p < 0.001$) relative to the intact animals. For ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, the injection of NMDA-receptor modulators caused a dose-dependent decrease in NSE levels (2-6 times, $p < 0.05$) and S100 protein (2-3 times, $p < 0.05$) with a maximal effect in amantadine sulfate in a dose of 5 m/kg i/v, memantine in a dose of 20 mg/ kg per os, magnesium sulfate in a dose of 250 mg/kg i/v.

The ischemic affection of the visual analyzer is associated with an increase in the level of cytometric markers of apoptosis (cells in the SUB-G0G1 phase) and neuroglyoproliferative activity (cells in phase S) at 20.2 and 7.1 times ($p < 0.001$) for the 1st day, at 14, 8 and 6.0 times ($p < 0.001$) on the 7th day, respectively. In the traumatic affection of the visual analyzer in the rabbits, the percentage of retinal cells in the SUB-G0G1 phase and in the S-phase was higher at 14.6 and 4.41 times

at the 1st day; in 10.0 and 7.70 times - on the 7th day ($p < 0.001$). For the ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, the injection of NMDA-receptor modulators caused a decrease in cellular particles in the SUB-G0G1 phase (1.6-2.6 times) and phase S (1.5-3.0 times, $p < 0.05$) with a maximum effect on amantadine sulfate. Inhibitors of NMDA receptors significantly reduce (in 1.5-2.5 times, $p < 0.05$) microcirculatory disturbances of an ischemic and a traumatic damage to the visual analyzer with a maximum effect on amantadine sulfate.

Ischemic defeat of the visual analyzer in rats on the 7th day after restoration of blood circulation is characterized by a decrease in the level of ATP (2.6 times, $p < 0.001$), increased levels of MDA, carbonyl groups of proteins, nitrates and nitrites, glutamate (2.4-2.7 times, $p < 0.001$), a decrease in the activity of glutathione peroxidase (2.4 times, $p < 0.001$) at the 1st day with a reliable, but a weak deescalation of these changes (1.2-1.3 times, $p < 0.05$). The injury of the visual analyzer of traumatic genesis characterized by an energy deficit, signs of oxidative and nitrosative stress, an increase in glutamate levels in the retina at the 1st day with a worsening (in 1.3-1.5 times, $p < 0.05$) of all detected violations by the 7th day. The use of NMDA-receptor modulators reduces metabolic disturbances in the retina of the eye through ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, with amantadine sulfate (5 mg/kg i/v) exceeding memantine (20 mg/kg per os) in 1.2-1.5 times ($p < 0.05$) by the ability to correct energy deficit, suppress the activity of lipoperoxidation processes and oxidative modification of proteins, to restore antioxidant activity of glutathione peroxidase. Amantadine sulfate is compared with memantine due to the ability to adjust the level of NO metabolites and reduce glutamate levels in the retina of the eye for ischemic and traumatic damage to the visual analyzer in animals.

For the ischemic damage to the visual analyzer, the strongest link was detected between the serum NSE level and the level of glutamate in the retina ($r = 0.72$, $p < 0.05$), while the association with other metabolic markers was median ($r = |0.45-0.62|$, $p < 0.05$). For the traumatic damage to the visual analyzer, on the contrary, the strongest link was detected between the serum NSE level and the

content of ATP ($r = -0.70$), markers of oxidative and nitrosative stress in the retina ($r = 0.66-0.78$, $p < 0.05$), and with the level of glutamate the bond was of an average strength ($r = 0.56$, $p < 0.05$). The S100 protein most strongly correlates with the level of glutamate, the carbonyl groups of proteins, the activity of glutathione peroxidase ($r = |0.56-0.68|$, $p < 0.05$) for both ischemic and traumatic damage to the visual analyzer. The association between markers of neurotrophin destruction and metabolic changes in the retina of the eye under the NMDA-receptor modulators action decrease in its strength and lose its statistical significance.

Thus, the role of modulators of the various sites of NMDA-receptors in the mechanisms of neuroretinoprotection for the lesions of the visual analyzer of ischemic and traumatic genesis has been determined. For the first time, the feasibility of correction of neuroretin-destructive changes in eye ischemia/reperfusion and contusive eye injury with the help of the inhibitor of the amine diamine sulfate polyamine site and the inhibitor of the pentacyclidine site of memantine has been substantiated, and the efficiency of the blocker of the ion channel of magnesium sulfate has been shown. It was established that the effect of inhibitors of NMDA receptors on the ischemic and traumatic injury of the visual analyzer is realized not only due to the modulation of glutamate excitotoxicity, but also because of the decrease of the microcirculatory disorder in the retina, the decrease in the level of proinflammatory and proapoptotic factors, and increased activity of glutathione peroxidase in the retina. For the first time has been shown that amantadine sulfate significantly exceeds memantine for its ability to accelerate depression of NSE and S100 protein in the blood, to correct the cell cycle (with the reduced DNA fragmentation) and metabotropic effect.

The practical value of the results obtained is to justify the use of pharmacological modulators of NMDA receptors (amantadine, memantine, magnesium sulfate) for a new purpose, namely, for the purpose of differentiated neuro-retinoprotective therapy for lesions of the visual analyzer of ischemic and traumatic genesis. Extended theoretical notions about the role of NSE and S100 in the mechanisms of glutamate excitotoxicity after ischemic and traumatic damage to

the visual analyzer. The peculiarities of the implementation of the neuroretinoprotective action of modulators of various sites of NMDA-receptors, which enable the purposeful development of new drugs - inhibitors of the polyamino site.

Key words: eye ischemia, contusion of the visual analyzer, neuroretinoprotection, NMDA receptors, amantadine sulfate, memantine, magnesium sulfate.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Комнацька К. М., Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Комплексний підхід до доклінічної оцінки безпеки нейроретинопротекторів при різних шляхах введення // Вісник морфології. 2015. 21(2). С. 379-385. *(Особистий внесок - визначення фонових рівнів нейромаркерів в сироватці крові методом ІФА, участь у дослідженні показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, участь в обробці та аналізі результатів щодо груп інтактних та псевдооперованих тварин, участь у формулюванні висновків та підготовці статті до друку).*
2. **Повх В. Л.** Нейроретинопротекторні властивості модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні ока (експериментальне дослідження) // Вісник морфології. 2016. 22(1). С. 53-57.
3. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Використання нейромаркерів (білок S 100) та методу протокової цитометрії для порівняльної оцінки впливу блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока // Світ медицини та біології. 2016. 2(56). С. 159-164. *(Особистий внесок – участь в моделюванні ішемії/реперфузії ока у щурів, дослідження впливу блокаторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові методом ІФА, дослідження цитометричних маркерів в сітківці ока щурів, статистична обробка матеріалу, оформлення статті).*
4. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Загорій Г. В., Ходаковський А. А. Цереброваскулярные эффекты блокаторов NMDA-рецепторов и мексидола на фоне аллоксанового сахарного диабета, а также их влияние на течение метаболических процессов в сетчатке монгольских песчанок в острый постперфузионный период // Врач-аспирант. 2016. 74(1.2). С. 295-303. *(Особистий внесок – проведення частини досліджень щодо показників метаболічного стану сітківки ока тварин, статистична обробка отриманих результатів та написання частини статті).*

5. **Повх В. Л.,** Ходаківський О. А., Ходаківський М. А. Порівняльна оцінка величини антиапоптозного ефекту серед модуляторів активності NMDA-рецепторів в умовах модельної перехідної ішемії реперфузії ока за даними протоково-цитометричного аналізу // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2016. 4. С. 84-87. *(Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, підготовка та моделювання ішемії /реперфузії ока у тварин, проведення цитометричних досліджень в суспензії клітин сітківки, аналіз та статистичній обробка отриманих даних, участь в обговоренні результатів та формулюванні висновків, оформлення статті).*
6. **Повх В. Л.,** Фоміна Л. В., Ходаківський М. А., Ходаківський О. А. Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюса ока після контузії або в гострий постреперфузійний період на тлі реканалізації а. ophthalmica // Буковинський медичний вісник. 2017. 1(81). С. 106-111. *(Особистий внесок - відтворення модельної патології, доплерографічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка та переклад резюме, оформлення і подача до друку статті).*
7. Повх В. Л. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні зміни в сітківці при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(1). С. 136-141.
8. Povh V. L., Zaichko N. V., Melnyk A.V., Khodakivskiy O. A. Association of neuroretina destruction markers with retinal level of hydrogen sulfide in traumatic injury of the visual analyzer // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(2). С. 5-11 *(Особистий внесок дослідження показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, рівня глутамату в сітківці ока хроматографічним методом, обробка та аналіз результатів щодо груп інтактних тварин та кролів з контузійною травмою ока).*

9. Черешнюк І. Л., Комнацька К. М., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109789 Україна МПК А61F 9/00 Спосіб моделювання контузії ока для скринінгової оцінки нейроретинопротективної активності лікарських засобів та біологічно активних речовин. № у 201601524; заявл. 19.02.16; опубл. 12.09.16, Бюл. № 17, 2016 р. (*Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, участь у розробці та відтворенні модельної патології, участь у проведенні скринінгових досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка і оформлення патенту*).
10. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Комнацька К. М., Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109424 Україна МПК А61К 31/00 А61Р 27/02 Застосування цитопротекторів, вибраних з ряду цитиколіну, мелатоніну, мексидолу, корвітину, тіотриазоліну та розчину сульфату магнію, як нейроретинопротекторів. № у 201601703 ; заявл. 23.02.16; опубл. 25.08.16, Бюл. № 16, 2016 р. (*Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення досліджень у серії визначення нейроретинопротекторної активності магнію сульфату: моделювання патології, проведення лікування, забір матеріалу, виконання біохімічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування висновку*).
11. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А., Загорій Г. В. Оцінка ефективності експериментальної терапії контузії зорового аналізатора промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлориду („Адемол”) або амантадином сульфатом („ПК-МЕРЦ”) за маркером нейропроліферативних процесів – рівнем білка S-100 // VIII Нац. з’їзд фармацевтів України : тези доп., м. Харків, 13–16 верес. 2016 р. Х., 2016. С. 125–126. (*Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез*).

12. **Повх В. Л.** Морфо-функціональна оцінка офтальмопротекторних ефектів мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при експериментальній перехідній ішемії ока // V Міжнар. науково-практична конференція молодих вчених : тези доп., м. Вінниця, 15–16 трав. 2014 р. В., 2014. С. 142-145.
13. **Повх В. Л.,** Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка нейроретинопротекторної дії мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при контузійній травмі ока у кролів за активністю нейрон-специфічної енолази // Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, пам'яті професора В. В. Дунаєва : матеріали конф., м. Запоріжжя, 24-25 листоп. 2016 р. З., 2016. – С. 63-64. *(Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, виконання запланованих досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез до друку).*
14. **Повх В. Л.,** Черешнюк І. Л., Ходаківський О. А., Попова О. І. Перспективи сучасної нейроретинопротекції – фокус на модулятори розвитку глутаматної ексайтотоксичності // Науково-практична конференція з міжнародною участю „Філатовські читання – 2016”, присвячена 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я : матеріали конф., м. Одеса, 19-20 трав. 2016 р. О., 2016. С. 114. *(Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення експериментів, статистична обробка даних, підготовка, оформлення та подача тез).*
15. Ходаківський О. А., Ходаківська О. В., Петрик І. О., Погоріла А. В., **Повх В. Л.,** Комнацька К. М. Можливість використання нейро- та кардіомаркерів для фармакологічного скринінгу органопротекторів // Тези доп. V Нац. з'їзд фармакологів України : м. Запоріжжя, 18–20 жовтн. 2017 р. З., 2017. С. 133–134. *(Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз*

літературних джерел, проведення експериментів, статистична обробка отриманих даних, підготовка, оформлення та подача тез).

16. Ходаківський О. А., Черешнюк І. Л., Ходаківська О. В., Комнацька К. М., Петрик І. О., **Повх В. Л.**, Погоріла А. В., Жабоедова Н. В., Мельник А. В., Прокопенко С. В., Заїчко Н. В., Шінкарук-Диковицька М. М., Редькін Р. Г. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) // Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: матеріали ІХ Всеукр. наук.-практ. конфер. з міжнар. участю, м. Вінниця, 16–17 листоп. 2017 р. В. 2017. С. 269–273. *(Особистий внесок дисертанта: здійснював вивчення нейроретинопротекторної активності препаратів при травмі ока).*

ЗМІСТ

ВСТУП		19
РОЗДІЛ 1	БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКЦІЇ ЗА ІШЕМІЧНОГО ТА ТРАВМАТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА (огляд літератури)	26
	1.1 Біохімічні механізми ушкодження нейронів гангліозного шару сітківки за умов патології зорового аналізатору різного генезу. Роль глутаматної ексайтотоксичності	27
	1.2 Сучасні погляди на фармакологічну нейроретинотекцію за умов ураження зорового аналізатору різного генезу	38
	1.3 Перспективи застосування модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів при ретинодеструктивних ушкодженнях зорового аналізатору різного генезу	45
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	48
	2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей	48
	2.2 Біохімічні методи дослідження	55
	2.3 Цитометричні та функціональні методи дослідження	56
	2.4 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу	58
РОЗДІЛ 3	ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА ПОКАЗНИКИ НЕЙРОРЕТИНОДЕСТРУКЦІЇ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ТА ТРАВМАТИЧНОГО УРАЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА	59

3.1	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів	60
3.2	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів	68
3.3	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази, білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки за травматичного ураження ока у кролів	77
3.4	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на мікроциркуляцію сітківки за ішемічного та травматичного ураження ока у тварин	86
РОЗДІЛ 4	ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ В СІТКІВЦІ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ТА ТРАВМАТИЧНОГО УРАЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА	92
4.1	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за ішемічного ураження ока у щурів	93
4.2	Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за травматичного ураження ока у кролів	108
4.3	Зв'язок маркерів нейроретинодеструкції з метаболічними змінами в сітківці за ішемічного й травматичного ураження зорового аналізатора та за	121

дії модуляторів NMDA-рецепторів

РОЗДІЛ 5	УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	125
	ДОСЛІДЖЕННЯ	
ВИСНОВКИ		140
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ		143
ДОДАТКИ		168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AMPA	- α -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонова кислота
АТФ	- аденозинтрифосфорна кислота
в/в	- внутрішньовенно
в/шл	- внутрішньошлунково
ВНМУ	- Вінницький національний медичний університет
ГПО	- глутатіонпероксидаза
ДІ	- довірчий інтервал
ДНК	- дезоксирибонуклеїнова кислота
ІР	- ішемія / реперфузія
КГП	- карбонільні групи протеїнів
МДА	- малоновий діальдегід
МОЗ	- Міністерство охорони здоров'я
Me	- медіана
ПОЛ	- перекисне окиснення ліпідів
ERK	- кіназа, яка регулюється екстрацелюлярними сигналами
NADPH	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
NMDA	- N-метил D-аспартат
NO	- нітроген монооксид (оксид азоту)
NSE	- нейронспецифічна енолаза
NF- κ B	- ядерний фактор «каппа би»
PKB	- протеїнкіназа B
PKC	- протеїнкіназа C
S100	- білок S100

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Глутаматна ексайтотоксичність, асоційована з надмірною активацією NMDA-рецепторів, відіграє провідну роль в ураженні зорового аналізатора при ішемії, глаукомі [203], вторинній альтерації сітківки на тлі хірургічних втручань [62, 115]. Підвищення рівня глутамату та гіперактивація NMDA-рецепторів викликає ураження гангліонарних клітин сітківки внаслідок ініціації оксидативного стресу, апоптозу, запальної реакції [131, 156, 195]. В окремих роботах засвідчено, що інгібітор NMDA-рецепторів мемантин справляє нейропротективний ефект при експериментальному ураженні сітківки ока [40, 211]. Між тим, модуляція активності NMDA-рецепторів при ураженні зорового аналізатора може мати і інший вектор. Адже NMDA-рецептори залучені до регуляції постсинаптичної активності під час регенерації зорового нерва, а їх блокування викликає пригнічення спонтанної постсинаптичної активності фоторецепторів [132]. Тому більш детальне дослідження впливу модулаторів NMDA-рецепторів з різним механізмом дії на показники нейроретинодеструкції за експериментального ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора є доцільним.

Чутливими та специфічними маркерами альтерації нейронів ішемічного та травматичного генезу є зростання сироваткових рівнів NSE [102, 150] та білку S100 [150, 194]. NSE експресується в нейронах, астроцитах, олігодендроцитах, регулює нейрональну та гліальну активність і за високих концентрацій може стимулювати експресію прозапальних цитокінів, індукувати апоптоз [102]. NSE експресується в нейронах сітківки, пігментному епітелії та фоторецепторних клітинах, виявляється в екстрацелюлярному «міжфоторецепторному» матриксі [90], але питання щодо змін вказаного маркера в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора не з'ясовано. Білок S100 експресується в гліальних клітинах,

переважно астроцитах, належить до кальцій-, мідь- та цинк-зв'язуючих білків [126], залучений до Ca^{2+} -залежної активації гуанілатциклази (в тому числі і в клітинах сітківки ока) [208], дофамінового сигналіngu через взаємодію з D2-рецепторами дофаміну [149]. За низьких концентрацій білок S100 виявляє трофічний потенціал, а за високих - проапоптичну, прозапальну та нейродегенеративну дію [126]. Між тим, питання щодо змін рівня NSE та білка S100 в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора різної етіології та при введенні модуляторів NMDA-рецепторів не визначено.

Вивчення цих питань поглибить розуміння молекулярних механізмів нейроретинопротекції при ушкодженні зорового аналізатора травматичного та ішемічного генезу, дозволить обґрунтувати нові підходи до корекції цих патологічних станів модуляторами різних сайтів NMDA-рецепторів та вирішити актуальне завдання медичної біохімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках спільної планової НДР Науково-дослідного центру, Навчально-науково-дослідної лабораторії «Фармадар», кафедри фармакології, біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів», № держреєстрації 00115U007126; НДР кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті», № держреєстрації 0112U0021939.

Мета і завдання дослідження

Мета роботи – встановити роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження ока і на цій основі експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції патології зорового аналізатора.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Дослідити вплив фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів (блокатору поліамінового сайту амантадину, блокатору фенциклідинового сайту мемантину, блокатору іонного каналу магнію сульфату) на біохімічні маркери нейродеструкції - рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів.

2. Вивчити вплив фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів (амантадину, мемантину, магнію сульфату) на цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора.

3. Встановити вплив модуляторів NMDA-рецепторів (амантадину, мемантину, магнію сульфату) на показники мікроциркуляції сітківки ока за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора.

4. Дослідити вплив модуляції NMDA-рецепторів на метаболічні зміни (оксидативний стрес, енергодефіцит, стан системи оксиду азоту) в сітківці за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора.

5. Оцінити зв'язок маркерів нейродеструкції, показників апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки з метаболічними змінами в тканинах ока за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора і експериментально обґрунтувати нові підходи до нейроретинопротекції за участі модуляторів NMDA-рецепторів.

Об'єкт дослідження – механізми нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора.

Предмет дослідження – вплив модуляторів NMDA-рецепторів на маркери нейродеструкції (рівень нейронспецифічної енолази, білка S100), цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності

сітківки, метаболічні зміни в тканинах ока, показники мікроциркуляції при ішемічному та травматичному ушкодженні зорового аналізатора.

Методи дослідження: біохімічні (спектрофотометричні та хроматографічні методи оцінки маркерів глутаматної ексайтотоксичності, енергетичного стану, оксидативно-нітрозативного стресу), імуноферментні (визначення рівня нейронспецифічної енолази, білка S100), протокова цитометрія (визначення маркерів апоптозу, нейрогліопрولیферативної активності сітківки), функціональні (вимірювання внутрішньоочного тиску тонометром ICARE, лазердуплерографія судин модулем ВІОРАК, офтальмоскопія), фармакологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Визначена роль фармакологічних модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ураження зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу в досліджах *in vivo*. Експериментально обґрунтована доцільність корекції нейроретинодеструктивних змін за ішемії/ реперфузії ока та контузійної травми ока за допомогою інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату та інгібітора фенциклідинового сайту мемантину, засвідчена менша ефективність блокатору іонного каналу магнію сульфату.

Вперше показано, що за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора зростання рівня NSE та білка S100 в сироватці крові асоціюється із формуванням несприятливого метаболічного патерну (енергодефіциту, оксидативно-нітрозативного стресу, зростанням рівня глутамату), посиленням цитометричних ознак апоптозу (зростанням частки клітин у фазі SUBG0G1) та нейрогліопрولیферативної активності (зростанням частки клітин у фазі S) в сітківці ока у різні терміни досліджу. На відміну від ішемії/реперфузії ока із максимальними біохімічними змінами в сітківці у гострому періоді, за контузійної травми ока спостерігається подальша ескалація нейродеструктивних та дисметаболічних порушень.

Встановлено, що за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора нейроретинопротекторний ефект інгібіторів NMDA-рецепторів

реалізується не лише через модуляцію глутаматної ексайтотоксичності, і й через зменшення в сітківці ока мікроциркуляторних розладів, зниження рівня прозапальних та проапоптичних чинників (рівня NSE та білка S100 в крові, продуктів ліпопероксидації та карбонільних груп протеїнів в сітківці), підвищення активності глутатіонпероксидази в сітківці. Вперше засвідчено, що амантадину сульфат значуще перевершує мемантин за здатністю акселерувати деескалацію рівня NSE та білка S100 в крові, коригувати показники клітинного циклу (зі зниженням рівня фрагментації ДНК) та за метаботропним ефектом.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментально обґрунтована доцільність використання фармакологічних модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів (амантадину, мемантину, магнію сульфату) за новим призначенням, а саме з метою диференційованої нейроретинопротективної терапії при ураженні зорового аналізатора ішемічного та травматичного генеза. Розширені теоретичні уявлення про роль NSE та білка S100 в механізмах реалізації глутаматної ексайтотоксичності за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора. Встановлені особливості реалізації нейроретинопротективної дії модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів, що дають змогу проводити цілеспрямовану розробку нових лікарських засобів із зазначеним видом активності, зокрема інгібіторів поліамінового сайту.

Практичне значення результатів дисертаційного дослідження підтверджується 2 патентами України на корисні моделі (№ 109789; 109424).

Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова МОЗ України; кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова МОЗ України, кафедри фармакології та медичної рецептури Буковинського державного медичного університету МОЗ України, кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології Одеського національного медичного університету МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Дисертант особисто здійснив патентно-інформаційний пошук, проаналізував літературу за темою дисертації, разом із науковим керівником визначив мету й задачі, обрав методи дослідження. Опанував прийоми відтворення ішемічного ураження сітківки у тварин, у співавторстві розробив методологію контузійного ураження зорового аналізатора, засвоїв методики біохімічних, функціональних та цитологічних досліджень, після чого самостійно виконав експериментальну частину роботи., провів математичну обробку, статистичний аналіз отриманих результатів, сформулював висновки та підготував публікації до друку. Автор висловлює подяку за консультативну допомогу наступним співробітникам ВНМУ імені М.І. Пирогова МОЗ України: к.мед.н., ст.н.с. І.Л. Черешнюку при здійсненні протокові-цитометричного дослідження сітківки на базі Науково-дослідного центру, к.фарм.н., доц. О.В. Ходаківській при вивченні функціональних показників системної гемодинаміки на базі ННДЛ «Фармадар», д.мед.н., доц. кафедри біологічної та загальної хімії А. В. Мельнику при проведенні біохімічних досліджень.

Апробація результатів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено на V Науковій конференції молодих вчених з міжнародною участю (Вінниця, 2014); VIII Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва (Запоріжжя, 2016); Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Філатовські читання – 2016”, присвяченої 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії імені В.П. Філатова Національної академії медичних наук України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я (Одеса, 2016); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); IX Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України» (Вінниця, 2017).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 173 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина - 123 сторінки) і включає анотацію, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 2 розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних літературних джерел, що включає 223 найменувань (39 кирилицею, 184 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 41 рисунком та 15 таблицями.

РОЗДІЛ 1

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ПЕРСПЕКТИВНІ НАПРЯМКИ
НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКЦІЇ ЗА ІШЕМІЧНОГО ТА ТРАВМАТИЧНОГО
УШКОДЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА (огляд літератури)

За даними ВООЗ у світі 2,5% населення (приблизно 45 млн людей) страждають на сліпоту, а 135 млн. мають серйозні проблеми зору. До 2020 року прогнозується прогресивне зростання інвалідності по зору, яка може сягати 76 млн. населення світу. Все це стало поштовхом до створення світової програми ВООЗ «VISION-2020: Право на зір», метою якої є попередження втрати зору шляхом розробки ефективних засобів корекції уражень зорового аналізатора, які можуть ускладнюватись порушенням зору [2, 5].

Лідируючу позицію серед причин втрати зору займає патологія сітківки ока та зорового нерву ішемічного (оклюзія артерії та вени сітківки, діабетична ретинопатія, глаукома та ін.) та травматичного генезу, що надає цій проблемі медико-соціальної значимості. Велика поширеність цієї патології та швидкий розвиток ускладнень (особливо сліпоти) обумовлені відсутністю ефективних нейроретинопротекторних засобів, тобто фармакологічних препаратів, які одночасно коригують патологічні зміни в тканинах ока та зоровому нерві [2, 3, 38].

Тому, метою цього розділу є аналіз літературних даних щодо молекулярних механізмів деструкції нейронів гангліозного шару сітківки та шляхи нейроретинопротекції за умов ішемічного й травматичного ураження зорового аналізатору.

1.1 Біохімічні механізми ушкодження нейронів гангліозного шару сітківки за умов патології зорового аналізатору різного генезу. Роль глутаматної ексайтотоксичності

Травматичне та ішемічне ураження зорового аналізатора супроводжується розвитком деструкції гангліозних клітин сітківки, що є основною причиною порушення зору. Серед молекулярних механізмів нейроретинодеструкції за цих патологій можна виділити наступні: глутаматна ексайтотоксичність, запалення, оксидативний та нітрозативний стрес, апоптоз та стрес ендоплазматичного ретикулуму [2, 3, 8, 30, 165].

Глутаматна ексайтотоксичність. Термін «глутаматна ексайтотоксичність» описує процес загибелі нейронів під впливом високих концентрацій глутамату в міжклітинній рідині. Цей біохімічний механізм є пусковим в пошкодженні нейронів при ішемії [13, 30, 215].

У відповідь на ішемію в нейронах виникає дефіцит кисню та поживних речовин, порушуються іонні градієнти, розвивається деполяризація, що веде до виділення глутамату в міжклітинний простір. Ще однією із причин збільшення кількості глутамату в інтерстиції за цих умов є недостатність АТФ, що супроводжується порушення реаптейку глутамату нейронами. Високі концентрації глутамату активують іонотропні глутаматні рецептори. Вони містять як позаклітинний сайт зв'язування глутамату, так і трансмембранний іонний канал. Виділяють два основних підтипи іонотропних глутаматних рецепторів – NMDA-рецептори (N-метил-D-аспартатні) та AMPA-рецептори (α -аміно-3-гідрокси-5-метилізоксазол-4-пропіонова кислота) [13, 30, 138, 203, 215].

NMDA-рецептори представляють собою гетеротетрамер, який складається з двох GluN1 та двох GluN2 субодиниць (виділяють чотири ізоформи - A, B, C, D), які відносяться до трансмембранних білків і разом утворюють іонний канал. В NMDA-рецепторах GluN1 субодиниці

найчастіше поєднується з GluN2A або GluN2B. На поверхні субодиниць виділяють різноманітні сайти (рис. 1.1) [13, 30, 77, 138, 171, 203, 215]:

А) глутаматний сайт (розташований на GluN2 субодиниці) – це ділянка зв'язування глутамату (або N-метил-D-аспартату);

Б) гліциновий сайт (розташований на GluN1 субодиниці) – відноситься до регуляторної ділянки специфічного зв'язування гліцину. Показано, що гліцин посилює активність рецептору, а саме збільшує частоту відкриття іонного каналу. За умов відсутності гліцину рецептор не активується глутаматом;

В) алостеричні регуляторні сайти (розташовані на GluN1 та GluN2 субодиницях) – до них відносяться Mg^{2+} -сайт (зв'язування з іонами Mg^{2+} викликає блокування іонного каналу рецептора), Zn^{2+} -сайт (після зв'язування з відповідними іонами відбувається активація рецептора), поліаміновий та фенциклідиновий сайти (до них приєднуються речовини відповідної хімічної природи і модулюють активність рецептора. Наприклад амантадин блокує поліаміновий сайт, а мемантин - фенциклідиновий сайт).

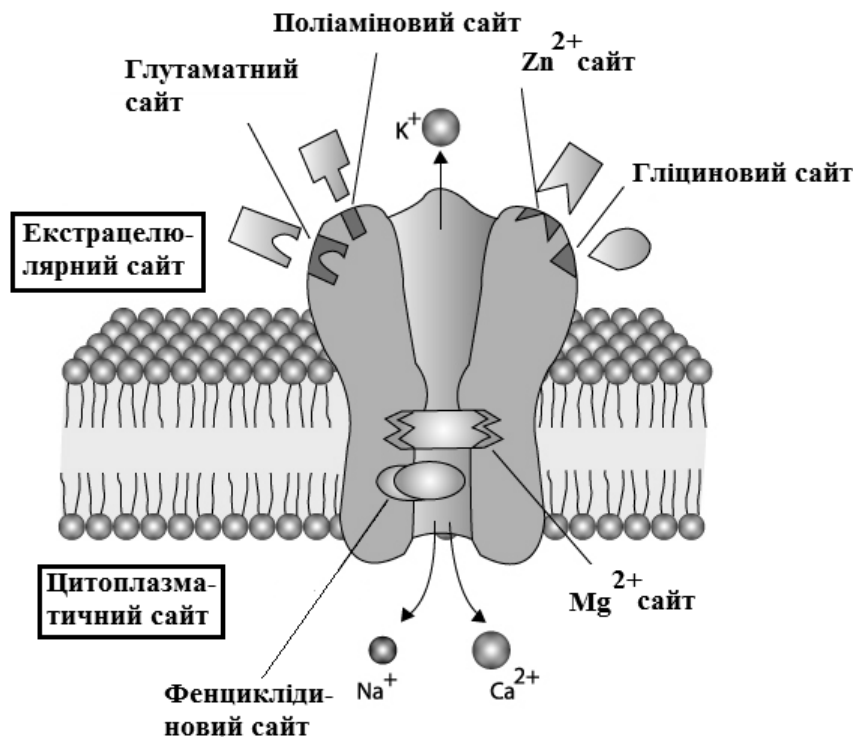


Рис. 1.1. Схема будови NMDA-рецептору.

У стані спокою іонний канал NMDA-рецепторів блокується Mg^{2+} . Накопичення глутамату в синаптичній щілині спричиняє активацію AMPA-рецепторів, часткову деполяризацію постсинаптичної мембрани та видалення іонів Mg^{2+} з іонного каналу, що спричиняє активацію NMDA-рецепторів. За цих умов через іонний канал рецептора в нейрон заходять великі кількості іонів Na^+ та Ca^{2+} в обмін на іони K^+ , які виходять з нейрону [186, 215]. Таким чином надлишок глутамату викликає надмірну активацію NMDA-рецепторів, що асоціюється з накопиченням в нейроні надлишку кальцію. Перевантаження нейронів кальцієм викликає низку подій: активація кальпаїну, утворення активних форм кисню, пошкодження мітохондрій, запалення, що призводить до некрозу або апоптозу нейронів [215].

Гіперактивація NMDA-рецепторів може супроводжуватись різноспрямованим впливом на апоптоз нейронів, що до певної міри визначається субклітинною локалізацією цих рецепторів та їх будовою [103, 140]. Показано, що активація синаптичних NMDA-рецепторів, які містять переважно GluN2A субодиниці, супроводжується пригніченням апоптозу нейронів, тоді як активація екстрасинаптичних рецепторів, в структурі яких переважають GluN2B субодиниці, викликає їх загибель. Стимулювання синаптичних NMDA-рецепторів попереджує апоптоз нейронів через різноманітні молекулярні механізми [103, 140, 164, 215]:

1) активується фосфоінозитид-3-кіназа (PI3K), яка фосфоризує протеїнкіназу В (PKB). У відповідь на це зменшується активність білку p53, проапоптичного білку Bcl-2 та кінази апоптозу ASK-1;

2) збільшується експресія кінази, яка регулюється екстрацелюлярними сигналами (ERK) та ядерної кальцій-кальмодулінзалежної протеїнкінази, що сприяє фосфорилуванню цАМФ-зв'язуючого білку (CREB) та його активацію. Активація CREB попереджує розвиток апоптотичної загибелі нейронів, адже цей білок стимулює експресію наступних генів: антиапоптотичного Bcl2, апоптотичного p53 супресора BCL6 та нейротрофічного фактора мозку.

Гіперактивація екстрасинаптичних NMDA-рецепторів супроводжується загибеллю нейронів шляхом апоптозу, що пояснюється зміною активності ряду сигнальних шляхів. За цих умов відбуваються наступні внутрішньоклітинні зміни [103, 116, 140, 164, 215]:

1) дефосфорилювання CREB, що супроводжується його інактивацією та пригніченням експресії антиапоптичних генів;

2) індукція експресії нейрональної ізоформи NO-синтази, що посилює синтез оксиду азоту, його зв'язування з супероксид-аніон радикалом та утворення пероксинітриду. Останній викликає перекисне окиснення ліпідів, протеїнів, пошкодження ДНК, активацію полі(АДФ)-рибозо-полімерази, що сприяє вивільненню мітохондріального індуктора апоптозу (AIF) в цитоплазму. AIF транслокується в ядро і викликає фрагментацію ДНК та смерть клітини;

3) активація кальпаїну, який викликає розщеплення ряду білків. Протеоліз натрій-кальцієвого обміннику (NCX-3) сприяє надмірному накопиченню кальцію в нейроні; розщеплення тирозинфосфатази (STEP) активує протеїнкіназу p38, яка пригнічує ендоцитоз екстрасинаптичних NMDA-рецепторів, в структурі яких переважають GluN2B субодиниці; руйнування кінази Kidins220 спричиняє зменшення активності ERK та CREB;

4) активація стресових білків сімейства міоген-активованих протеїнкіназ (MAPK), а саме p38 (активує нейрональну ізоформу NO-синтази) та кінази JNK (стимулює експресію проапоптичних генів);

5) убіквітинування інсулін-індукованого гену-1 (INSIG1) в ендоплазматичному ретикулумі, що сприяє перміщенню транскрипційного фактору SREBP1 (залучений до регуляції метаболізму ліпідів) в комплекс Гольджі, де відбувається його активація. Далі активований SREBP1 транслокується в ядро та стимулює експресію проапоптичних генів.

Надмірна активація NMDA-рецепторів супроводжується розвитком оксидативного і нітрозативного стресу (рис. 1.2) [155, 215]. Накопичення кальцію в нейронах асоціюється з прямою активацією НАДФН-оксидази та

збільшенням продукції супероксидного аніон-радикалу. Поряд з цим зростання активності цього прооксидантного ензиму супряжено з активацією протеїнкінази С (PKC) на тлі гіперстимуляції глутаматних рецепторів [49, 60, 95, 99, 155, 209]. За цих умов розвиток нітрозативного стресу обумовлений гіперпродукцією оксиду азоту під впливом нейрональної ізоформи NO-синтази, яка активується протеїнкіназами В та С. В присутності великих концентрацій супероксидного аніон-радикалу, оксид азоту утворює ще один реакційноздатний радикал пероксинітрит, який є потужним активатором процесів перекисного окиснення ліпідів, окисної деградації протеїнів, викликає пошкодження плазматичної та субклітинних мембран нейронів, мітохондріальну дисфункцію [57, 72, 155, 191, 193, 198, 199].

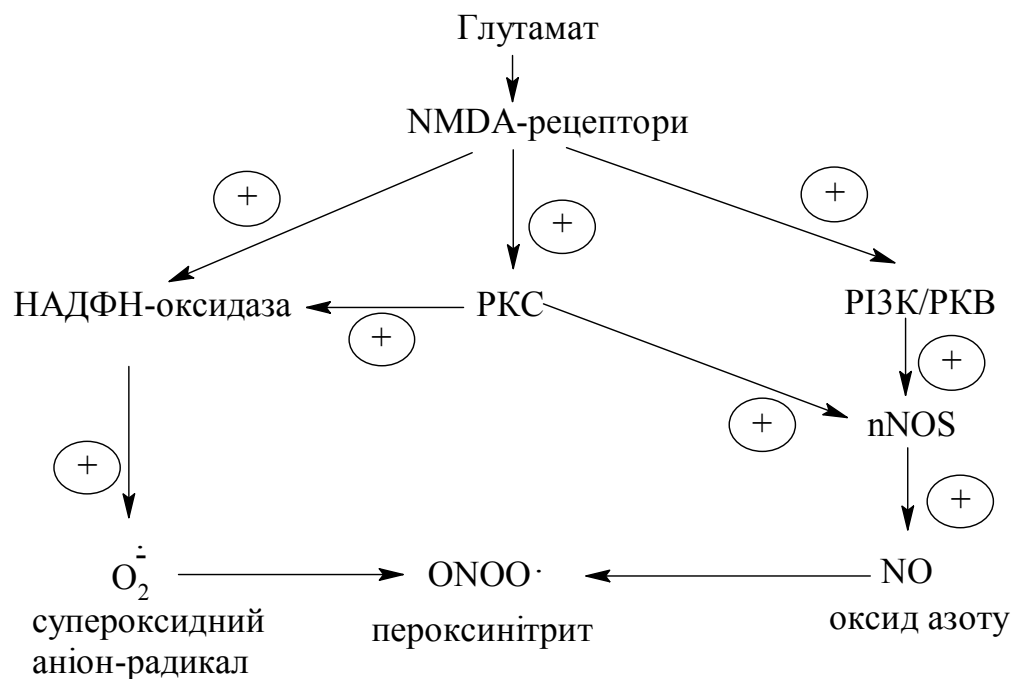


Рис. 1.2. Механізм ініціювання оксидативно-нітрозативного стресу на тлі гіперактивації NMDA-рецепторів.

Глутаматна ексайтотоксичність опосередковується також через розвиток нейрозапалення. На тлі стимулювання NMDA-рецепторів активується р38 MAPK сигналінг та накопичуються активні форми кисню й

нітрогену, що супроводжується збільшенням експресії ядерного фактору NF-κB та посиленням синтезом прозапальних цитокінів [44, 205, 215].

Оксидативний стрес. На тлі ішемічного та травматичного пошкодження гангліонарних клітин сітківки розвивається гіпоксія, порушується повне відновлення молекулярного кисню до двох молекул води у дихальному ланцюгу внутрішньої мембрани мітохондрії, що супроводжується утворенням активних форм кисню (супероксидного аніон-радикалу, гідроген пероксиду та гідроксильного радикалу (рис. 1.3) [18, 51, 123, 145, 176].



Рис. 1.3. Механізм утворення активних форм кисню на тлі гіпоксії.

Поряд з цим виникає дисбаланс в системі про- та антиоксиданти [48, 71, 119, 134, 177]. Відмічається зростання активності прооксидантних ензимів НАДФН-оксидази й ксантиоксидази та зниження активності глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази. Тобто, за умов ішемічного та травматичного ураження ока створюються умови, які викликають накопичення активних форм кисню. Останні спричиняють ряд патологічних змін: активують процеси вільнорадикального окиснення ліпідів, протеїнів і ДНК, викликають пошкодження мембран клітин, мітохондріальну дисфункцію, індують експресію ядерного фактору NF-κB, активують p38 MAPK сигналінг, ініціюють апоптоз та розвиток запальної реакції [80, 176, 184]. Останнім часом показано, що активні кисневі деривати також ініціюють ізомеризацію цис-арахідонової кислоти в транс-форму, яка стимулює утворення тромбоспондину – потужного антиангіогенного та проапоптичного фактору [47, 58, 108, 128, 176].

Запалення. Розвиток запальної реакції є важливим елементом патогенезу ішемічного ураження зорового аналізатора за різних патологічних станів [55, 89, 148, 151, 157, 170, 178, 220]. Травма та ішемія зорового аналізатора супроводжується загибеллю нейронів шляхом апоптозу чи некрозу, що викликає накопиченням в міжклітинній рідині «молекул пошкодження» (білок S 100, мітохондріальні білки, сечова кислота, група білків з високою рухливістю HMGB1 та ін.). Вказані молекули розпізнаються специфічною групою рецепторів PRRs, які локалізовані на імунних клітинах (рис. 1.4) [54, 64, 189, 190]. Серед цих рецепторів визначальну роль в запаленні відіграють саме Toll-like рецептори, стимуляція яких супроводжується збільшенням експресії ядерного фактору NF-κB та активацією p38 MAPK сигналінг [42, 43, 70, 83, 84, 104, 110, 125, 130, 139, 173]. В результаті цього зростає продукція хемокінів, молекул клітинної адгезії, прозапальних цитокінів, інтерферону-γ та активується інфламосома. Остання представляє собою внутрішньоклітинний мультимерний білковий комплекс, який утворюється у відповідь на взаємодію «молекул

пошкодження» з рецепторами PRRs. Активна інфламосома забезпечує перетворення неактивної прокаспази-1 в активну каспазу-1, яка в свою чергу сприяє трансформацію попередників цитокінів IL1 β та IL18 в їх активні форми [63, 67, 100, 101, 112, 153, 154, 197].

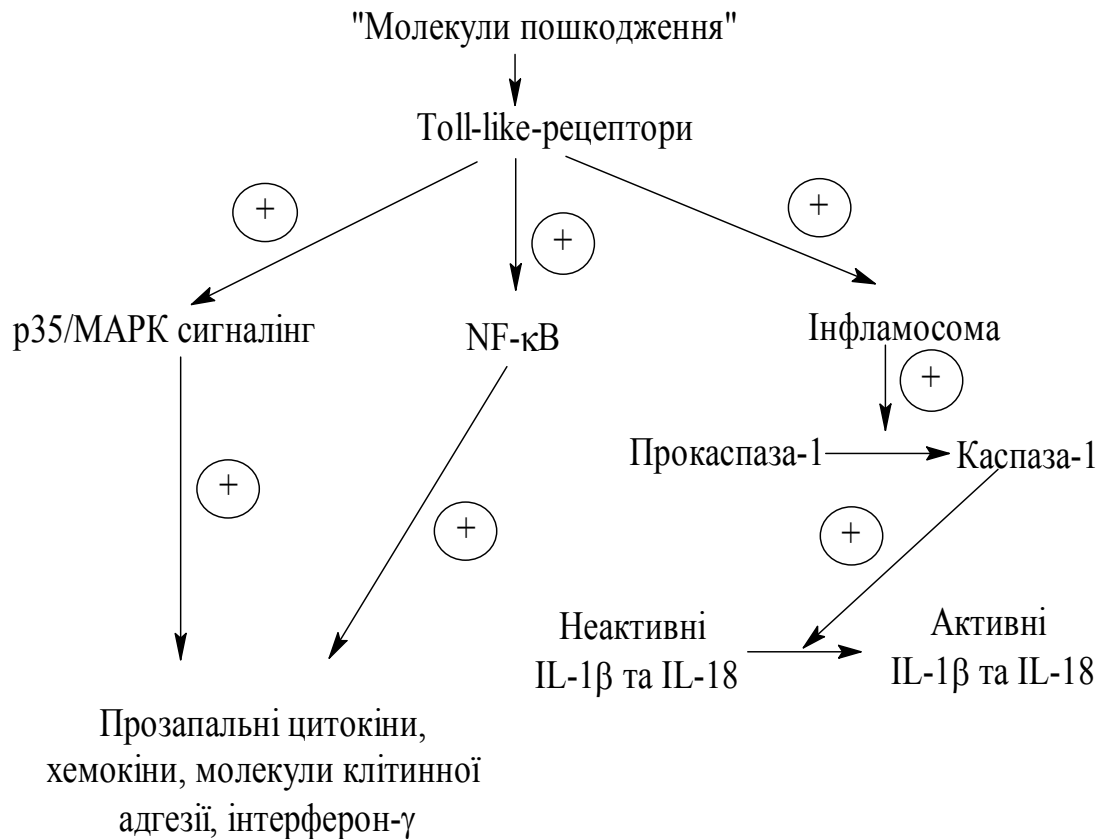


Рис. 1.4. Механізм ініціювання запалення за умов травматичного та ішемічного пошкодження зорового аналізатору.

В експериментальних дослідженнях показано, що в перші 5-12 годин після ішемії / реперфузії сітківки ока у щурів відмічалось різке зростання фактору некрозу пухлин TNF α , а на 6 год - рецепторів до цього цитокіну TNFR1 і TNFR2 [87, 93]. В свою чергу TNF α активує експресію інших цитокінів IL-8 та фактору росту ендотелію судин VEGF [219]. На моделі внутрішньоочної гіпертензії було показано, що застосування антитіл до TNF α в значній мірі покращувало стан сітківки ока [52]. Під час оклюзії середньої мозкової артерії виявлялось зростання в периферичній крові, тканинах мозку

та сітківки ока IL17 та інтерферон- γ [142]. За умов ішемії сітківки, індукованої експериментальною внутрішньоочною гіпертензією, реєстрували зростання вмісту IL6 [182]. Ішемія зорового аналізатора, викликана лігуванням зорових нервів у щурів, в перші 12 годин супроводжувалась значним зростанням цитокінів IL1 α і β [157].

Стрес ендоплазматичного ретикулулу. Ендоплазматичний ретикулум відіграє важливі функції в клітині, а саме забезпечує гомеостаз кальцію, регулює посттрансляційну модифікацію білків та зокрема їх фолдінг, бере участь в синтезі холестеролу, стероїдних гормонів, обміні вуглеводів, детоксикації лікарських засобів та ін. [59, 78, 114, 141, 143, 221]. За умов ішемії та травми зорового аналізатору розвивається стрес ендоплазматичного ретикулулу, що супроводжується порушенням гомеостазу кальцію та незавершеним фолдінгом протеїнів [107, 141, 143, 183, 222]. У відповідь на це в клітині активуються різні сигнальні системи, які забезпечують припинення синтезу нових білків та активацію повторного фолдінгу протеїнів зі зміненою просторовою структурою. Спершу активується протеїнкіназа PERK шляхом відщеплення від неї шаперону GRP78. Активна PERK фосфорилує і інактивує α -субодиницю еукаріотичного фактора ініціації трансляції eIF2 α , що супроводжується блокуванням рибосомального синтезу поліпептидів [45, 96, 107, 141, 143, 183, 222]. Далі активуються трансмембранна протеїнкіназа IRE-1 та активуючий транскрипційний фактор ATF-6 також шляхом відщеплення від них GRP78, що супроводжується посиленням експресії ряду генів, які забезпечують синтез шаперонів, необхідних для фолдінгу протеїнів зі зміненою конформацією [79, 163, 214, 216, 222]. У випадку неефективного повторного фолдінгу протеїнів шаперон GRP78 активує внутрішньоклітинні системи, які забезпечують їх протеосомну деградацію. Поряд з цим гіперактивація протеїнкіназ PERK, IRE-1 та транскрипційного фактору ATF-6 в клітині супроводжується низкою патологічних змін [183, 222]:

1) активується кіназа JNK, яка є складовою MAPK сигналіngu, що супроводжується розвитком нейрозапалення;

2) виникає мітохондріальна дисфункція, яка супряжена з активацією апоптотичної загибелі нейронів;

3) активується експресію генів, які кодують синтез білків родини VEGF, відповідальних за ріст судин. У відповідь на це розвивається неоваскуляризація сітківки ока, що є однією із важливих причин втрати зору на тлі ішемічного та травматичного пошкодження зорового аналізатору.

Апоптоз. Пошкодження гангліонарних клітин сітківки на тлі ішемії та травми ока супроводжується активацією апоптозу трьома шляхами: зовнішній, внутрішній та опосередкований каспазою-12 (рис. 1.5). Зовнішній шлях апоптозу активується молекулами, які виділяються у відповідь на пошкодження нейронів, а саме Fas лігандом, TNF α та ін. [76, 121, 211]. Ці молекули взаємодіють з відповідними «рецепторами смерті», що сприяє послідовній внутрішньоклітинній активації ферментів сімейства каспаз – каспази-8, каспази-3 та каспази смерті CAD (шляхом відщеплення від неї інгібітора ICAD). Остання каспаза безпосередньо викликає фрагментацію ДНК та апоптотичну загибель нейронів.

Внутрішній шлях активується на тлі оксидативного стресу, ішемії, пошкодження ДНК та супроводжується відкриттям пор мітохондрії внаслідок зменшення рівня антиапоптотичних (BCL2, BCL w та BCL xL) та збільшення кількості проапоптотичних (BAX, BID, BAK, BAD, BOX та BCL xS) білків, які регулюють проникність мембрани мітохондрії [76, 211]. У відповідь на це відбувається вихід цитохрому c та послідовна активація каспази-9, каспази-3 та каспази смерті CAD.

Апоптоз, опосередкований каспазою-12, активується на тлі стресу ендоплазматичного ретикулуму [61, 109, 117, 146, 159, 204, 207, 218]. За цих умов відбувається вихід кальцію та послідовна активація кальпаїну, каспази-12 та каспази-3. Поряд з цим відмічається активація кінази JNK, яка сприяє експресії проапоптотичних генів та фрагментації ДНК. Також, високі

концентрації кальцію викликають активацію кінази глікогенсинтази GSK-3 β , яка зв'язана з білком p53, і є промотором p53-індукованого апоптозу, а також викликає активацію кінази JNK. Білок p53 є сенсором, який контролює перебіг клітинного циклу та стабільність геному. При виникненні генетичних дефектів білок p53 стимулює синтез проапоптотичних білків та пригнічує утворення антиапоптотичних білків, що сприяє відкриттю мітохондріальної пори та активації апоптозу по внутрішньому шляху. Крім того білок p53 на рівні транскрипції індукуює синтез Fas та DR5/KILLER і тому активує апоптоз по зовнішньому шляху [56, 97].

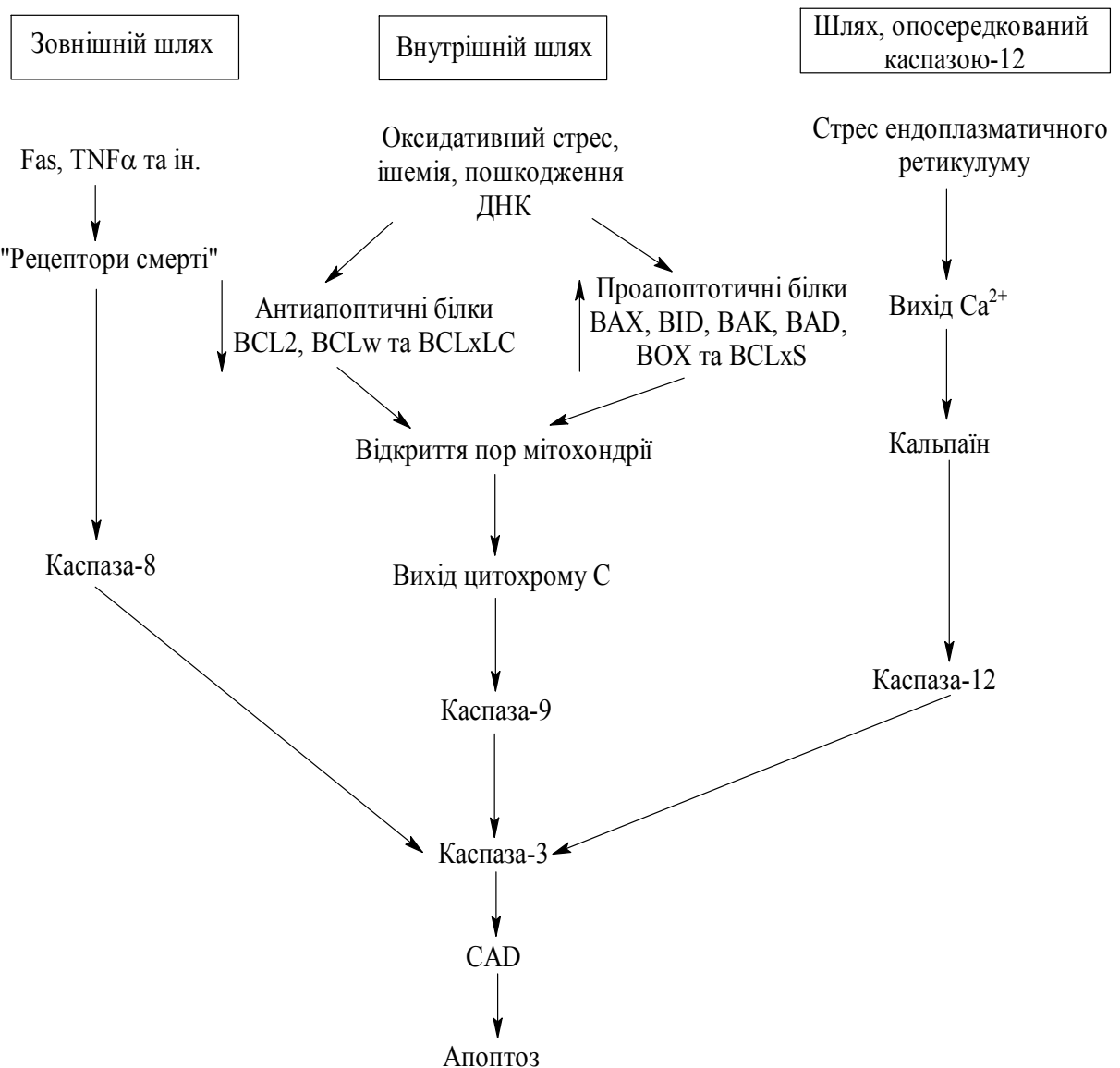


Рис. 1.5. Молекулярні механізми активації апоптозу за умов травматичного та ішемічного пошкодження зорового аналізатору.

Таким чином ми розглянули основні молекулярні механізми, які спричиняють пошкодження та загибель гангліонарних клітин сітківки ока при травмі та ішемії. Зауважимо, що ураження сітківки ока травматичного та ішемічного генезу реалізується через спільні молекулярні механізми, однак послідовність їх включення в патологічний процес відрізняється залежно від типу ураження. Так, за умов ішемічного ураження зорового аналізатора спершу виникає глутаматна ексайтотоксичність, а далі розвивається оксидативно-нітрозативний стрес, запалення, стрес ендоплазматичного ретикулуму та апоптоз гангліонарних клітин [2, 215]. Натомість, травматичне ураження ока викликає первинну альтерацією клітин сітківки, розвиток оксидативно-нітрозативного стресу, запалення, стресу ендоплазматичного ретикулуму, вихід глутамату в міжклітинний простір, що в подальшому супроводжується глутаматною ексайтотоксичністю та вторинною альтерацією клітин сітківки [68, 73, 158, 185, 192].

1.2 Сучасні погляди на фармакологічну нейроретинопротекцію за умов ураження зорового аналізатору різного генезу

У відповідь на травму та ішемію в клітинах сітківки ока розвивається складний каскад патобіохімічних реакцій, кожний етап якого є потенційною мішенню для фармакологічної корекції [3, 4]. Розрізняють первинну нейроретинопротекцію, яка забезпечує переривання ішемічного каскаду на ранніх етапах за рахунок блокування глутаматної ексайтотоксичності, а також вторинну нейроретинопротекцію – направленої на переривання відстрочених механізмів загибелі гангліонарних клітин сітківки – оксидативного стресу, стресу ендоплазматичного ретикулуму, запалення та апоптозу. Враховуючи молекулярні механізми ураження зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу, виділяють наступні перспективні засоби фармакологічної нейроретинопротекції: антагоністи

NMDA-рецепторів та блокатори кальцієвих каналів; протизапальні, антиоксидантні та антиапоптичні засоби; нейротрофічні фактори.

Антагоністи NMDA-рецепторів та блокатори кальцієвих каналів.

Важливою біохімічною ланкою патогенезу ішемічного та травматичного ураження гангліонарних клітин сітківки є активація глутамат-кальцієвого. Тому, з точки зору нейроретинопротекції перспективними є блокатори NMDA-рецепторів та кальцієвих каналів [3, 4]. Застосування мемантину - блокатору фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів зменшував нейродегенеративні зміни та порушення ангіогенезу в сітківки ока щурів на тлі діабетичної ретинопатії [136]. Поряд з цим на моделі гострої ішемії / реперфузії показано, що застосування мемантину зменшує ішемічне пошкодження гангліонарних клітин сітківки [217]. В той же час, використання цього антагоніста NMDA-рецепторів у дорослих осіб з глаукомою в III фазі клінічних досліджень не показав нейроретинопротекторні властивості, що може бути свідченням різних патофізіологічних механізмів індукції ішемії сітківки за вказаних патологій [187]. На сьогодні залишається невивченим питання щодо впливу антагоністів інших сайтів NMDA-рецепторів на ретинодеструктивні ушкодження зорового аналізатору.

Використання блокаторів кальцієвих каналів також асоціюється зі зменшенням ретинодеструкції за умов ішемічних ушкоджень ока. Показано, що застосування ніфедіпіну та, особливо, нілвадіпіну, зменшує кількість TUNEL-позитивних клітин, та попереджує загибель гангліонарних клітин та потоншення сітківки [200]. Використання ще одного блокатору кальцієвих каналів тетрандріну на моделі експериментальної транзиторної ішемії сітківки супроводжувалось зменшенням мітохондріальної дисфункції, оксидативного стресу та апоптозу клітин сітківки [144]. Введення змішаного інгібітору кальцієвих каналів L та N- типів клінідіпіну на тлі ішемії сітківки, індукованої внутрішньоочною ін'єкцією NMDA, викликало виражений нейропротективний ефект [181]. За цих умов блокатор повільних кальцієвих

каналів L2 типу амлодипін не виявляв ретинопротекторних властивостей [181]. Очевидно, це пов'язано з тим, що ці канали в меншій мірі задіяні до ішемічного ураження гангліонарних клітин. В клінічних дослідженнях також доведена ефективність використання блокаторів кальцієвих каналів. Виявилось, що використання ніфедіпіну у пацієнтів з передньою ішемічною нейропатією асоціювалось з вірогідним зростанням гостроти зору та виявляло коригуючий вплив на світлочутливість сітківки та величину порогу електричної чутливості по фосфену [2].

Антиоксидантні, антиапоптичні та протизапальні засоби.

Оксидативний стрес, запалення та апоптоз є важливими взаємопов'язаними патогенетичними ланками ураження гангліонарних клітин сітківки, тому застосування препаратів, які виявляють антиоксидантні, антиапоптичні та протизапальні властивості, є виправданим з метою нейропротекції. Використання антиоксидантних вітамінів асоціювалось з нейропротекцією при різних ішемічних захворюваннях сітківки ока. Каротиноїди лютеїн та зеаксантин покращували зорову функцію за умов вікової макулярної дегенерації, ішемічної та діабетичної ретинопатії, катаракти, що пов'язують з їх антиоксидантним ефектом [120, 129]. Застосування зеаксантину при лікуванні макулярної дегенерації супроводжувалось виразним нейропротективним ефектом, що підтверджено у великих трайлових дослідженнях [66]. Каротиноїд астаксантин зменшував ступінь ураження сітківки на моделі ішемії / реперфузії, що асоціювалось з його здатністю зменшувати загибель клітин сітківки, послаблювати процеси вільнорадикального окиснення та відновлювати нормальний перебіг електрофізіологічних процесів [166]. Вітаміни С та Е посилювали активність антиоксидантних ензимів глутатіонпероксидази та супероксиддисмутази у сітківці ока та попереджували прогресування діабетичної ретинопатії [91, 118, 168]. Ліпоева кислота, яка є скавенджером активних форм кисню, чинила депримууючий вплив на апоптоз гангліонарних клітин та їх

оксидативне пошкодження за умов діабетичної ретинопатії та травматичного ураження зорового нерву [135, 147].

Важливе місце в антиоксидантній терапії ретинодеструктивних ушкоджень відіграють біофлавоноїди. Показано, що використання ресвератролу за умов експериментального цукрового діабету зменшує в сітківці експресію генів, залучених до ангіогенезу, оксидативного стресу та запалення і тому виявляє нейропротекторні властивості [188]. Поряд з цим ресвератрол зменшував ураження сітківки на тлі ішемії / реперфузії у мишей, що асоціюється з його антиоксидантною активністю, антиапоптичними властивостями, які реалізуються через його інгібуючий вплив на експресію генів каспази-3 та каспази-8. пригніченням апоптозу, а також здатністю пригнічувати стрес в ендоплазматичному ретикулумі (зменшує активність IRE-1 сигнального шляху та рівень eIF2 α) [141]. Використання кверцетину за умов ішемічного ураження сітківки зменшувало потонщення шарів сітківки та супроводжувалось виразним антиапоптичними ефектом [41].

Препарат супероксиддисмутази Рексод нормалізував гідродинамічні та метаболічні процеси та попереджував дегенерацію зорового нерву у людей з глаукомою [1, 9]. За цієї патології виразні нейропротекторні властивості показав мексидол – препарат з політропними властивостями (нейропротектор, антигіпоксанти та ноотропи). За результатами клінічних досліджень мексидол збільшував гостроту зору, покращував електрофізіологічні та периметричні показники у пацієнтів з I-III стадіями глаукоми [10]. На експериментальних моделях глаукоми у щурів протекторну активність щодо клітин сітківки показав препарат мелатоніну, який виявляє потужні антиоксидантні властивості [50]. Проте рандомізованих клінічних досліджень по цьому препарату не проводилось. За умов глаукоматозної оптиконеуропатії використання природного антиоксиданту Гінко білоба супроводжувалось значним зменшенням деструкції клітин сітківки, що пов'язано з такими його властивостями:

антиоксидантами, вазодилатуючими, здатністю інгібувати продукцію оксиду азоту та факторів активації тромбоцитів [9].

Застосування ліпідознижуючої терапії, зокрема фібратів, попереджувало прогресування діабетичної ретинопатії та зменшує вміст вільних жирних кислот, які індукують оксидативний стрес в сітківці ока [65, 127, 213, 223]. За результатами двох мультицентрових плацебо-контрольованих трайлових досліджень (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes and Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (FIELD); Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)) використання фенофібрату пригнічувало прогресування діабетичної ретинопатії у дорослих пацієнтів з цукровим діабетом II типу. Ретинопротекторні ефекти фенофібрату пов'язують з його антиоксидантами, антиапоптичними та протизапальними властивостями. Поряд з цим він забезпечує відновлення геморетинального бар'єру, індукує протизапальні властивості сіртуїн-1-залежного сигнального шляху, який блокує експресію ядерного фактору NF- κ B.

Виразні протизапальні властивості виявляють препарати глюкокортикоїдів, які показали значні нейроретинопротекторні властивості за умов ішемії сітківки. Використання метилпреднізолону на моделі ішемічної оптичної нейропатії у щурів покращував стан геморетинального бар'єру, зменшував загибель гангліонарних клітин, що тісно корелювало з його здатністю знижувати рівень прозапальних цитокінів TNF α та IL1 β [111]. Проведене багатоцентрове плацебо-контрольоване дослідження показало, що застосування дексаметазону у пацієнтів з оклюзією центральної вени сітківки викликає покращення зорової функції та зменшує потоншення шарів сітківки [210]. В інших дослідженнях показано, що використання дексаметазону за цієї патології також зменшує макулярний набряк [167]. Інтравітреальне введення тріамцінолону щурам з оклюзією центральної вени сітківки виявляє нейроретинопротекторну активність, яка асоціюється з інгібуванням

експресії генів, відповідальних за синтез прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-6, а також відновленням калієвого гомеостазу [175].

Останнім часом в експериментальних дослідженнях широко використовуються інгібітори прозапальних цитокінів. Так, використання етанерцепту – інгібітору TNF- α на моделі гострої ішемії, ініційованої внутрішньоочною гіпертензією, вірогідно зменшувало ураження оптичного нерву [46]. Поряд з цим цей препарат показав виразні нейроретинопротекторні властивості за умов діабетичної нейропатії [81]. Застосування цилостазолу, інгібітору TNF- α -індукованого-NF- κ B-сигнального шляху, за умов експериментальної ішемії / реперфузії зменшує проникність судин, попереджує загибель гангліонарних клітин, покращує електрофізіологічні властивості, а також викликає збільшення товщини шарів сітківки [113]. За умов ішемії сітківки на тлі підвищення внутрішньоочного тиску, застосування інгібіторів циклооксигенази та ліпооксигенази показали різний вплив на стан клітин сітківки [86, 180]. Так, застосування неселективних інгібіторів циклооксигенази-1 та 2, а також інгібіторів ліпооксигенази не виявляло нейрпротекторних властивостей, тоді як інгібування лише циклооксигенази-2 справляє виразний протекторну дію на клітини сітківки. Таким чином подальші до клінічні та клінічні дослідження інгібіторів прозапальних цитокінів та інгібіторів синтезу простагландинів є перспективним напрямком фармакологічної нейроретинопротекції.

Нейротрофічні фактори. Перспективним напрямком нейроретинопротекції є використання нейротрофічних факторів. Останнім часом проводяться ряд експериментальних досліджень щодо їх протекторної ролі на клітини сітківки за умов діабетичної ретинопатії. Так, субкон'юнктивальне введення інсуліну зменшує загибель гангліонарних клітин сітківки за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів [88]. Застосування інсуліноподібного фактору росту IGF-1 попереджує прогресування діабетичної ретинопатії [92].

PEDF - пептид з нейротрофічними властивостями, який продукується клітинами пігментного епітелію сітківки, і виявляє нейропротекторний вплив на фоторецептори [85, 88, 149, 169, 196, 206]. Системне введення цього пептиду діабетичним щурам попереджує активацію Мюллерівських клітин та ретинальну дисфункції. Поряд з цим на моделі непроліферативної діабетичної ретинопатії PEDF показав антиангіогенні властивості, які асоціювались з його здатністю зменшувати синтез фактору росту судин VEGF. За цих умов PEDF виявляє також властивості антиоксиданту та протизапального агенту. За умов ішемії сітківки застосування VEGF активує експресію глутаматного транспортеру, зменшує рівень глутамату в інтерстицію та попереджує гіперактивацію NMDA-рецепторів.

Нейропептид SST експерсується в сітківці та контролює вивільнення глутамату. За умов стрептозотин-індукованого діабету місцеве введення цього нейропептиду виявляє потужний нейроретинопротекторний ефект, що супряжено з його здатністю зменшувати глутаматну ексайтотоксичність [105].

Трофічні чинники нейронів NTs є сімейством структурно і функціонально споріднених білків, які є необхідними для росту, диференціації нейронів сітківки, глії та ендотеліальних клітин [162]. Основними членами цієї родини є BDNF та NGF. У діабетичних щурів в сітківці ока знижується рівень BDNF, а внутрішньовенне введення цього пептиду попереджує розвиток нейродегенерації [106]. Також показано, що збільшення експресії BDNF у стрептозотин-індукованих діабетичних щурах шляхом внутрішньоочної ін'єкції векторної плазмиди з вірусом, асоційованим з BDNF, супроводжувалось покращенням функціонування гангліозних клітин [98]. Механізм нейропротекторної дії BDNF в сітківці ока обумовлений зменшенням цитотоксичного набряку гліальних та біполярних клітин сітківки [53]. Внутрішньоочне введення щурам з діабетом NGF запобігає апоптозу гангліонарних клітин сітківки та клітин Мюллера, а також втрату перицитів та утворення ацеллюлярних капілярів [106].

Таким чином, останнім часом проводяться інтенсивні експериментальні дослідження щодо необхідності та доцільності застосування антагоністів NMDA-рецепторів та блокаторів кальцієвих каналів, протизапальних, антиоксидантних та антиапоптичних засобів, а також нейротрофічних факторів з метою нейроретинопротекції за умов ураження зорового аналізатору різного генезу.

1.3 Перспективи застосування модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів при ретинодеструктивних ушкодженнях зорового аналізатору різного генезу

Враховуючи наведені дані стосовно провідної ролі глутаматної ексайтотоксичності у розвитку деструктивно-дегенеративних змін в сітківці при її ішемічному або травматичному ураженні, в якості перспективних нейроретинопротекторів нашу увагу привернули саме блокатори NMDA-рецепторів – похідні адамантану (мемантин і амантадину сульфату) та розчин магнію сульфату. Відомо, що амантадин є блокатором поліамінового сайту, мемантин - блокатор фенциклідинового сайту, магній сульфат – блокатор іонного каналу NMDA-рецепторів. Покази до їх призначення не розглядаються в площині органопротекції з прикладною точкою та можливістю застосування в невідкладній офтальмологічній практиці, що потребує ґрунтовної доклінічної оцінки у цьому напрямку [3, 29, 30].

Вперше, амантадин було запропоновано у ролі антивірусного препарату. У подальшому встановлено, що даний лікарський засіб стимулює вивільнення дофаміну з внутрішньонейронального пулу, підвищуючи рецепторну чутливість до нього, і навіть в умовах недостатності останнього у базальних гангліях, нормалізує перебіг нейрофізіологічних процесів. Завдяки модулювальному впливу амантадину на активність NMDA-рецептори, цей препарат знайшов своє застосування при лікуванні екстрапірамідних порушень при хворобі Паркінсона, дискінезій різного генезу (викликаних

прийомом леводопи, нейролептиків тощо) [122, 161]. Фармацевтична промисловість випускає два хімічні підрозділи солей похідних амантадину: сульфатну та гідрохлоридну солі. Серед гідрохлоридів амантадину відомі такі препарати як мідантан, неомідантан, амантадин; сульфатів – ПК-Мерц. Амантадину сульфат та гідрохлорид майже не різняться за своїми фармакодинамічними активами, однак мають відмінності за фармакокінетичними параметрами. Амантадину сульфат забезпечує більш стабільну концентрацію препарату в структурах мозку, ліпше переноситься хворими і йому притаманні порівняно менші побічні явища. Лікарські засоби на основі амантадину гідрохлориду (наприклад, мемантин) широко застосовуються при терапії судинної деменції, хвороби Альцгеймера і розсіяного склерозу [122, 161]. Винайдено водорозчинну форму амантадину сульфату ПК-Мерц – препарат для довенного застосування. На сьогодні тривають клінічні дослідження стосовно ефективності цього розчину при черепно-мозковій травмі та судинних захворювань ЦНС [17, 19, 39, 94].

Із-поміж неповних блокаторів NMDA-рецепторів, своєю безпечністю та довготривалою історією клінічного застосування виділяється сульфат магнію [186]. Встановлено, що іони магнію потенціал-залежно блокують NMDA-асоційовані канали. На моделях експериментальної церебральної ішемії доведено, що на тлі застосування магнію сульфату відбувається суттєва, достовірна редукція ділянки ішемії, а у пацієнтів із гострою церебральною ішемією, інфузія цього препарату зменшує летальність та сприяє редукції неврологічного дефіциту поряд із поліпшенням неврологічного статусу [152, 186].

Таким чином, є вагоме підґрунтя для доклінічної оцінки ефективності зазначених блокаторів NMDA-рецепторів за новим призначенням в якості нейроретинопротекторів при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора.

Висновок до розділу Недосконалі результати лікування уражень зорового аналізатора ішемічно-гіпоксичного або травматичного генезу,

асоційовані зі значною інвалідизацією хворих, здебільшого можна пов'язати із відсутністю дієвих нейроретинопротекторів, спроможних однаково ефективно впливати на всі ланки ішемічного каскаду, що і обґрунтовує медично-соціальну значущість розробки та впровадження препаратів цього класу. Глутаматна ексайтотоксичність, яка опосередкована надмірною активацією NMDA-рецепторів, дисбаланс у системі енергозабезпечення, оксидативно-нітрозативний стрес, активація апоптозу, запалення - перспективний вектор, у напрямку якого доцільно здійснювати фармакологічну розробку первинної нейроретинопротекторної терапії, в тому числі й за рахунок розширення показань до застосування вже зареєстрованих лікарських засобів із NMDA-модулюючою дією.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей

Дослідження проведені на 272 білих нелінійних щурах-самцях (вік - 10-12 тижнів, початкова маса тіла - 160-190 г) та 156 кролях-самцях породи Шиншила (вік - 10 місяців, маса тіла - 3,0-3,9 кг). Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані методичні рекомендації Державного фармакологічного центру МОЗ України і вимоги біоетики згідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». Дотримання етичних норм засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І.Пирогова (протокол №10 від 11.10.2017 р.).

Усі тварини (щурі, кролі) перебували у віварії ВНМУ ім. М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні (із вільним доступом до води та корму), при температурі 20-24°C, відносній вологості повітря 50-55 % та 12-годинному режимі освітлення. Основний раціон тварин включав фуражне зерно, хліб, коренеплоди (буряк, морква), трава, повнораціонний гранульований комбікорм. Джерелом води була охолоджена кип'ячена вода у скляних поїлках. Рандомізація тварин в групи відбувалась методом мінімізації відмінностей за масою. Період акліматизації тварин перед включенням у дослідження становив 10 діб. За день до початку дослідження всі тварини оглядалися кваліфікованим зоотехніком. До дослідження залучались виключно здорові тварини.

Розподіл тварин на серії дослідів відповідно до мети та завдань дослідження наведений в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин за серіями експериментів

№№ серії	Напрямки експериментального дослідження		Кількість тварин
1	2		3
Модель ішемії / реперфузії зорового аналізатора у щурів			
1	Вивчення впливу ішемії-реперфузії на біохімічні маркери нейродеструкції - рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки щурів		24
2	Вивчення впливу ішемії-реперфузії на метаболічні процеси в сітківці щурів	вміст АТФ, глутамату, нітритів та нітратів	28
		вміст маркерів оксидативного стресу	28
4	Вивчення впливу фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів з різним механізмом дії (блокаторів поліамінового сайту, фенциклідинового сайту, іонного каналу) на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів		66
5	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки щурів за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів		35
6	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні процеси в сітківці ока за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів	вміст АТФ, глутамату, нітритів та нітратів	28
		вміст маркерів оксидативного стресу	28
7	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на показники мікроциркуляції сітківки ока за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів		35
Всього щурів			272

1	2	3
Модель травматичного ураження зорового аналізаторів у кролів		
1	Вивчення впливу травми ока на біохімічні маркери нейродеструкції - рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопрولیферативної активності сітківки кролів	24
2	Вивчення впливу травми ока на метаболічні процеси (вміст АТФ, глутамату, показники нітрозативного та оксидативного стресу) в сітківці кролів	18
3	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопрولیферативної активності сітківки за травматичного ураження зорового аналізатора у кролів	40
4	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці ока за травматичного ураження зорового аналізатора у кролів	24
5	Вивчення впливу модуляторів NMDA-рецепторів на показники мікроциркуляції сітківки ока за травматичного ураження зорового аналізатора у кролів	50
Всього кролів		156

Всі маніпуляції з тваринами проводили у стандартних умовах, в ранковий період (з 9-ої до 12-ої години). Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового («Fresenius Kabi», Австрія) наркозу (60 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о), або внутрішньовенно (в/в)).

Модель гострої ішемії / реперфузії ока із постреперфузійним ураженням сітківки у щурів. Для відтворення ішемії сітківки ока використовували модель однобічної ішемії-реперфузії (IP) в басейні а. ophthalmica у щурів. IP створювали шляхом накладання ретробульбарної лігатури на ліве око щура терміном на 1 годину. Для створення тотальної ішемії ока ретробульбарні лігатури затягували до зникнення кровотоку в судинах сітківки і фіксували зажимами. Через 60 хв. після ішемії,

ретробульбарні лігатури обережно розпускали і знімали. Після зняття лігатури кровобіг в а. ophthalmica швидко відновлювався самостійно. Контролем слугувала група псевдооперованих щурів, яким накладали ретробульбарні лігатури без наступного затягування. Стан очного дна контролювали за допомогою прямої офтальмоскопії (попередньо наносили на рогівку гель) через покривне скло. До накладання ретробульбарної лігатури у щурів виявлялась звичайна картина очного дна, яка не змінювалась і після накладання ретробульбарної лігатури на а. ophthalmica (рис. 2.1 А). За умов ІР у щурів через 60 хвилин виявлялись порушення кровопостачання по а. ophthalmica та ішемічні зміни сітківки (рис. 2.1 Б), які зменшувались станом на 24 год та 7 добу.

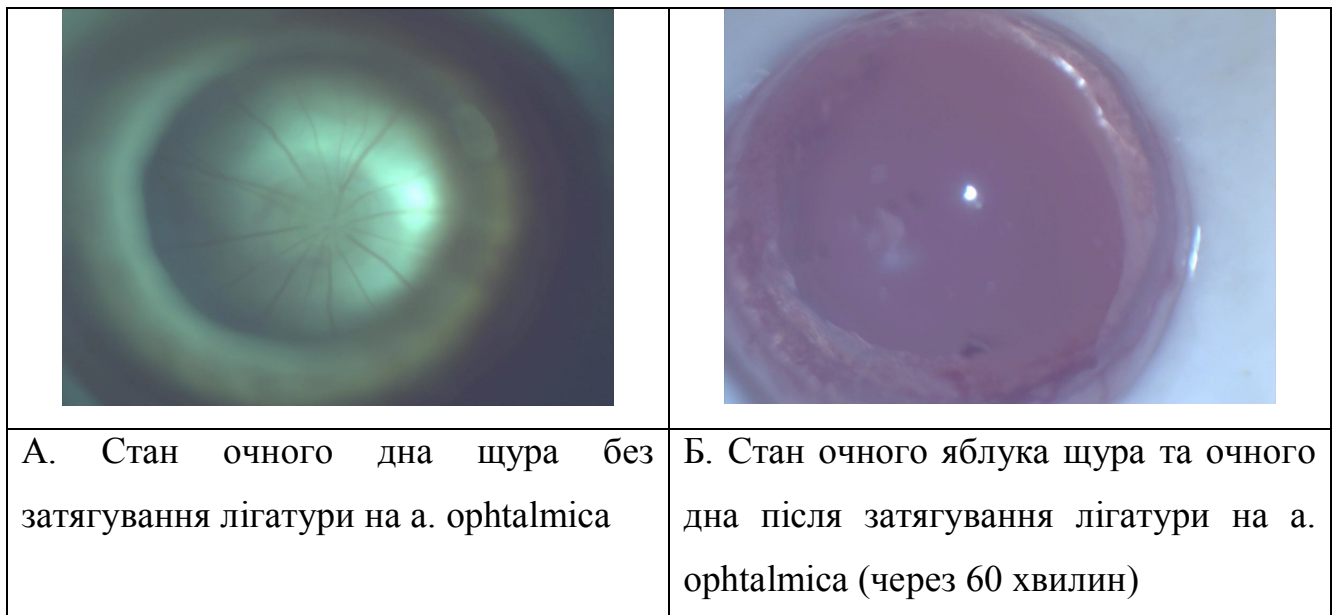


Рис. 2.1 Мікрофотографія стану очного дна ока щура до моделювання патології (А) та після затягування ретробульбарної лігатури на а. ophthalmica (Б). Прямая офтальмоскопія (власне спостереження).

На моделі ІР у щурів оцінювали можливі нейроретинопротекторні ефекти модуляторів NMDA-рецепторів при постреперфузійному ураженні сітківки. В якості фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів були застосовані - блокатор поліамінового сайту амантадин, блокатор фенциклідинового сайту мемантин, блокатор іонного каналу магнію сульфат.

Вказані засоби вводили тваринам через 30 хв. після накладання ретробульбарної лігатури на а. ophthalmica 1 раз на добу. Введення препаратів проводили у дозах, які за даними літератури є достатніми для блокади NMDA-рецепторів у щурів при різних патологічних процесах у мозку. Для мемантину ця доза складає 20 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) [137], для амантадину сульфату – 5 мг/кг внутрішньовенно (в/в) [11], для магнію сульфату – 250 мг/кг в/в [11]. Згідно рекомендацій по доклінічній оцінці препаратів, або біологічно-активних сполук із цито- та органопротекторною активністю при скринінгу умовно-ефективної дози їх доцільно додатково вивчити у більш широкому перерахунку доз за рахунок зменшення та підвищення удвічі тої дози, на тлі застосування якої перший раз при скринінгу зареєстровано найбільш виразну проєктивну активність [3]. Тому, мемантин додатково досліджували дозами 10 мг/кг та 40 мг/кг в/ш, а розчини амантадину і магнію сульфату відповідно дозами 2,5 і 10 та 150 і 350 мг/кг в/в. Група контрольної патології (тварини з ІР без цитопротекторної терапії) отримувала 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/в. Для в/ш введення мемантину через металічний орогастральний зонд (діаметр 22 G), готували його суспензію із твіном-80 та вводили в/ш із розрахунку 2 мл/кг. Розчини амантадину, магнію сульфату, 0,9% розчин NaCl вводили в/в упродовж перших 2 год з моменту накладання лігатури у катетеризовану (катетер, ERG 22 G, Польща) стегнову вену за допомогою інфузоматної системи В. Braun (Німеччина). Різниця між дизайном терапії при скринінгу та оцінці лікувального ефекту полягала в тому, що у першому випадку біологічний матеріал (кров, сітківка) забирали через 24 год, а у другому випадку - на 7-му добу терапії.

Модель травматичного ураження зорового аналізаторів у кролів.

Експериментальну контузію ока у кролів, викликану дією потоку вуглекислого газу під тиском, створювали із використанням газобалонного пневматичного пістолету марки «Байкал МР-654К» (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) з використанням балонів вуглекислого

газу (маса зрідженого CO_2 – 12 г) під тиском (Crosman, США, № серії 456739). Постійність тиску CO_2 на рівні дульного зрізу контролювали, шляхом попередньої реєстрації швидкості польоту сферичної сталюї кульки (Кросман, США, № серії 03675482), калібром 4,5 мм масою 0,3 г на відстані 1 см від внутрішнього дульного отвору через індукційний надульний хронометр X 741 (Україна). Встановлено, що при використанні балонів вуглекислого газу (t повітря = 19 °С, $P_{\text{атм}} = 720\text{-}755$ мм. рт. ст.) однакової серії № 03675482, при здійсненні наступних 10 пострілів з інтервалом 5 хв. після перших 5 пробних, швидкість польоту кульки була сталою, без достовірних коливань і складала 105-110 м/с. При таких швидкісних характеристиках, на рівні дульного зрізу тиск вуглекислого газу був однаково незмінним, що дозволяє відтворювати контузію ока в однакових умовах у всіх серіях при використанні балону вуглекислого газу, не більш ніж як у 10 експериментальних пострілах. При моделюванні контузії ока у кролів отвір затворної рами пневматичного пістолету притулений до центру рогівки ока тварини, попередньо наркотизованої пропофолом дозою 40 мг/кг в/в (Fresenius Kabi, Австрія). У тварин через 1 годину після контузії ока при офтальмоскопії (рис. 2.2) виявлялась гіперемія кон'юнктиви, набряк рогівки, деталі очного дна не візуалізувались.



Рис. 2.2. Status oculorum через 1 годину після відтворення модельної контузії ока (власне спостереження).

При травматичному ураженні зорового аналізатора небажаним є зміни внутрішньоочного тиску (ВОТ), тому ми оцінили вплив досліджуваних модуляторів на динаміку ВОТ при системному їх застосуванні у тварин без офтальмопатології (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Динаміка внутрішньоочного тиску (ВОТ) у кролів без офтальмопатології на тлі курсового семиденного системного застосування мемантину, амантадину та магнію сульфату ($M \pm m$, $n=10$)

Препарати	ВОТ (мм.рт.ст.) до введення препаратів (фон)	ВОТ (мм.рт.ст.), після останнього введення препаратів, год.		
		1	2	3
0,9 % розчин NaCl	7,20±0,33	7,31±0,33	7,10±0,27	7,10±0,34
Амантадину сульфат (2,5 мг/кг в/в)	7,11±0,27	7,22±0,41	7,20±0,27	7,31±0,31
Амантадину сульфат (5 мг/кг в/в)	7,41±0,19	6,61±0,19	6,43±0,22	6,54±0,14
Амантадину сульфат (10 мг/кг в/в)	7,13±0,23	7,14±0,27	7,41±0,29	7,03±0,25
Мемантин (20 мг/кг в/ш)	7,22±0,21	7,51±0,31	7,02±0,25	6,81±0,30
Магнію сульфат (250 мг/кг в/в)	6,90±0,20	4,8±0,25 *#	6,91±0,23	6,73±0,18

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ відносно фонового рівня у відповідній групі;
2. # – $p < 0,05$ відносно 0,9 % розчину NaCl.

ВОТ вимірювали тонометром ICARE (Фінляндія). Спершу оцінювали фонний рівень, а далі визначали його зміни через 1, 2 та 3 години після

введення досліджуваних модуляторів. Так, у динаміці спостереження, пероральне застосування мемантину дозою 20 мг/кг не супроводжувалось статистично вірогідними змінами ВОТ. На відміну від цього, на тлі курсової в/в інфузії амантадину сульфату 5 мг/кг відмічено лише тенденцію до деескалації ВОТ відносно його середніх фонових показників ($p > 0,05$). Після останньої в/в інфузії кролям розчину магнію сульфату, у перший часовий проміжок (1 год), середнє значення показника ВОТ було нижчим за фонові значення в середньому на 30,4 % ($p < 0,05$). Однак, вже через 60 хв. досліджуваний показник співставлявся з числовими даними вихідних значень ВОТ.

Отримані результати стали підставою вилучення магнію сульфату із дизайну дослідження (гіпотензивний ефект цього препарату при даній патології є небажаним). Перше введення досліджуваних препаратів здійснювали через 60 хв. після травми з інтервалом у 12 год. Як і на моделі ІР, у частини дослідних груп терапія тривала добу, а у іншій - 7 діб, залежно від мети експериментів. Водорозчинні препарати вводили в/в у крайову вену вуха.

2.2. Біохімічні методи дослідження

Біохімічні дослідження виконані на базі кафедри біологічної та загальної хімії та науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02.03.2015) за безпосередньої участі автора.

Сироватку крові отримували центрифугуванням цільної крові при 1500 g 15 хв при 18-22°C. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при -20°C до проведення дослідження. В сироватці крові визначали вміст маркера нейродеструкції - нейронспецифічної енолази (NSE; КФ 4.2.1.11) методом імуноферментного аналізу за набором «NSE ELISA KIT» (DAI, США) та білка S 100 за набором «S 100 ELISA KIT» (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція).

Через 24 години після моделювання патології проводили енуклеацію, очні яблука промивали охолодженим розчином 1,15 % KCl (4-8°C), позбавляли кон'юнктиви та м'язів, з допомогою мікрохірургічного інструментарію видаляли передній відділ ока і кришталик, залишок надрізали, розправляли так, щоб було видно очне дно, і видаляли ділянки сітківки. Сітківку гомогенізували протягом 1-2 хв. в охолодженному середовищі 1,15 % KCl (у співвідношенні маса/об'єм 1:4) при 3000 об/хв. Центрифугували 30 хв. при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Еппендорфа і до проведення досліджень зберігали при -20°C.

В гомогенатах сітківки ока визначали вміст малонового діальдегіду (МДА) за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [6], карбонільних груп протеїнів (КГП) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгіdraзином [12]. Рівень загального білка визначали мікробіуретовим методом [16]. Активність глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9) визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненого глутатіону [7]. Сумарний вміст нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині амоніаку [15]. Вміст аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) визначали у свіжовиготовленому безбілковому трихлороцтовому екстракті сітківки 1:10 (10% розчин трихлороцтової кислоти) методом тонкошарової хроматографії [28]. Вміст глутамату визначали методом тонкошарової хроматографії [27].

2.3 Цитометричні та функціональні методи дослідження

Цитометричні дослідження виконані на базі НДЛ функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова за безпосередньої участі к.мед.н., старшого наукового співробітника І.Л. Черешнюка, за що автор висловлює йому глибоку вдячність.

Вміст ДНК в ядрах клітин сітківки кролів визначався методом протокової цитометрії на багатофункціональному науково-дослідному однойменному цитометрі “Partec PAS” (Partec, Німеччина). Суспензії ядер з клітин сітківки отримували за допомогою наборів для дослідження ядерної ДНК, відповідно, CyStain DNA Step 1 та CyStain DNA Step 2 (Partec, Німеччина) до складу яких входить діамідинофенілндол (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовували ультрафіолетове випромінювання. Якість промаркованих ядерних суспензій перевіряли за допомогою флуоресцентного мікроскопу ЛЮМАМ Р-8 (ЛОМО, СРСР) (ультрафіолетове збудження), цифрової камери TSVIEW (TUCSEN, Китай) з роздільною здатністю матриці 8 Мп. Із кожного зразка нуклеарної суспензії аналізували 20 тис. об'єктів, що містять ДНК. Визначали наступні показники: G0G1 – відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G0G1 клітинного циклу із вмістом ДНК = 2с (с – content – «вміст») до їх загальної дослідної кількості; S – відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі синтезу ДНК із її вмістом $> 2с$ та $< 4с$ до їх загальної дослідної кількості; визначення фрагментації ДНК (апоптоз), виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах RN1 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК $< 2с$.

Дослідження мікроциркуляції виконані на базі Науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук «Фармадар» при ВНМУ ім. М.І. Пирогова за безпосередньої участі автора.

Вплив препаратів на мікроциркуляцію в умовах ІР ока у щурів, або травми ока у кролів вивчали за допомогою лазер-доплерографічного модуля ВІОРАК (США). В експериментах на щурах та кролях датчик прикладали до заднього полюсу ока в межах локалізації ретробульбарної лігатури, зорового нерву та а. ophthalmica (при ІР), або в максимально дистально розташованій точці склери, яка доступна для зовнішнього огляду (при контузії ока).

Послідовно визначали фонові значення показника мікроциркуляції (в у.о.), його зміни на тлі ішемії (коли судина лігована) та після реперфузії або контузії на 3 год експерименту.

Кваліфікація використаних в роботі реактивів та препаратів.

В роботі використані реактиви L-глутатіон відновлений, глутамат, АТФ (Sigma, США), інші реактиви вітчизняного виробництва категорії х.ч.; набори «NSE ELISA KIT» (DAI, США), «S 100 ELISA KIT» (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція), «CyStain DNA Step 1 та CyStain DNA Step 2» (Partec, Німеччина), препарати мемантин («Мема» Актавіс-Україна, Україна), розчини амантадину («ПК-МЕРЦ», Merz Pharmaceuticals, Швейцарія) і магнію сульфату («Магнію сульфат-Дарниця», Дарниця, Україна).

2.4. Методи статистичної обробки цифрового матеріалу

Обробку первинного матеріалу проводили за допомогою універсальних статистичних програм MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA).

Визначали середнє значення, стандартні помилки. Для оцінки відмінностей показників застосовували при нормальному розподілі - параметричний t-критерій Ст'юдента, при відхиленні від нормального розподілу - непараметричні критерії U Мана-Уїтні та Краскела-Уолліса, нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірманом. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Результати наведено як $M \pm m$.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[34, 36]

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА ПОКАЗНИКИ НЕЙРОРЕТИНОДЕСТРУКЦІЇ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ТА ТРАВМАТИЧНОГО УШКОДЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА

Відомо, що глутаматна ексайтотоксичність, асоційована з надмірною активацією NMDA-рецепторів, відіграє провідну роль в ураженні зорового аналізатора при ішемії, глаукомі [202], вторинній альтерації сітківки на тлі хірургічних втручань [62, 115]. Підвищення рівня глутамату та гіперактивація NMDA-рецепторів викликає ураження гангліонарних клітин сітківки внаслідок ініціації оксидативного стресу, апоптозу, запальної реакції [131, 156, 195]. В окремих роботах засвідчено, що інгібітор NMDA-рецепторів мемантин справляє нейропротективний ефект при експериментальному ураженні сітківки ока [40, 212]. Між тим, модуляція активності NMDA-рецепторів при ураженні зорового аналізатора може мати і інший вектор. Адже NMDA-рецептори залучені до регуляції постсинаптичної активності під час регенерації зорового нерва, а їх блокування викликає пригнічення спонтанної постсинаптичної активності фоторецепторів [132]. Тому більш детальне дослідження впливу модуляторів NMDA-рецепторів з різним механізмом дії на показники нейроретинодеструкції за експериментального ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора є доцільним.

Чутливими та специфічними маркерами альтерації нейронів ішемічного та травматичного генезу є зростання сироваткових рівнів NSE [102, 150] та білку S100 [150, 194]. NSE експресується в нейронах, астроцитах, олігодендроцитах, регулює нейрональну та гліальну активність і за високих концентрацій може стимулювати експресію прозапальних цитокінів, індукувати апоптоз [102]. NSE експресується в нейронах сітківки,

пігментному епітелії та фоторецепторних клітинах, виявляється в екстрацелюлярному «міжфоторецепторному» матриксі [90], але питання щодо змін вказаного маркера в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора не з'ясовано. Білок S100 експресується в гліальних клітинах, переважно астроцитах, належить до кальцій-, мідь- та цинк-зв'язуючих білків [128], залучений до Ca^{2+} -залежної активації гуанілатциклази (в тому числі і в клітинах сітківки ока) [82, 208], дофамінового сигналіngu через взаємодію з D2-рецепторами дофаміну [149]. За низьких концентрацій білок S100 виявляє трофічний потенціал, а за високих - проапоптичну, прозапальну та нейродегенеративну дію [126]. Між тим, питання щодо змін рівня NSE та білка S100 в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора різної етіології та при введенні модуляторів NMDA-рецепторів не визначено.

Завданнями даного розділу роботи було встановити зміни сироваткових рівнів NSE та білка S100, цитометричних маркерів апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки за ішемічного та травматичного ураження ока; з'ясувати вплив фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів (блокатору поліамінового сайту амантадину, блокатору фенциклідинового сайту мемантину, блокатору іонного каналу магнію сульфату) на показники нейроретинодеструкції та мікроциркуляції сітківки.

3.1 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів

На першому етапі був досліджений рівень NSE в сироватці крові інтактних щурів, псевдооперованих щурів (накладання ретробульбарних лігатур без послідууючого затягування) та щурів з моделлю ішемії/ реперфузії (IP) ока (накладання ретробульбарних лігатур на 60 хвилин).

Результати наших досліджень показали (рис. 3.1), що у інтактних щурів рівень NSE в сироватці крові є низьким і в середньому за показником

медіани (Me) становив 0,300 (95% ДІ 0,225-0,350) нг/мл. Накладання ретробульбарних лігатур без послідуєчого затягування не супроводжувалось розвитком нейродеструктивних процесів в сітківці ока та зоровому нерві дослідних щурів. На користь такого твердження вказував низький сироватковий рівень NSE, маркера порушення мембранної цілісності нейронів, який у псевдооперованих тварин становив 0,310 (95% ДІ 0,250-0,360) нг/мл і співставлявся із таким у інтактних тварин. Моніторинг рівня NSE щурів з моделлю IP засвідчив, що даний патологічний стан супроводжується розвитком нейродеструктивних процесів в зоровому аналізаторі. Так, після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури, реєструвалось багаторазове зростання рівня NSE в сироватці крові через 24 години – до 3,38 (95% ДІ 3,11-4,33) нг/мл, що перевищувало показники у інтактних та псевдооперованих тварин в 10-11 разів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 3,4$, $p < 0,001$).

Дослідження рівня NSE в сироватці крові через 7 діб після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури засвідчило збереження постішемічних нейродеструктивних явищ в зоровому аналізаторі. Так, рівень NSE у дослідних щурів з моделлю IP на 7-му добу становив 1,25 (95% ДІ 1,074-1,96) нг/мл і був нижчим в 2,7 рази, ніж через 24 години, але залишався вищим в 4,03 рази відносно псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 2,88$, $p = 0,002$). Це свідчить про персистенцію процесу руйнування мембран нейронів сітківки та зорового нерву й виходу енлази у кровоносне русло. Цілком очевидно, що ступінь підвищення рівня NSE через 24 години після ішемії/реперфузії тканин ока може детермінувати перебіг постреперфизуйного ураження сітківки та зорового нерву в подальшому, оскільки цей ензим має прозапальні та проапоптичні властивості. З цієї точки зору, найбільш важливим є досягнення деескалації рівня NSE упродовж першої доби ішемічного ураження зорового аналізатору.

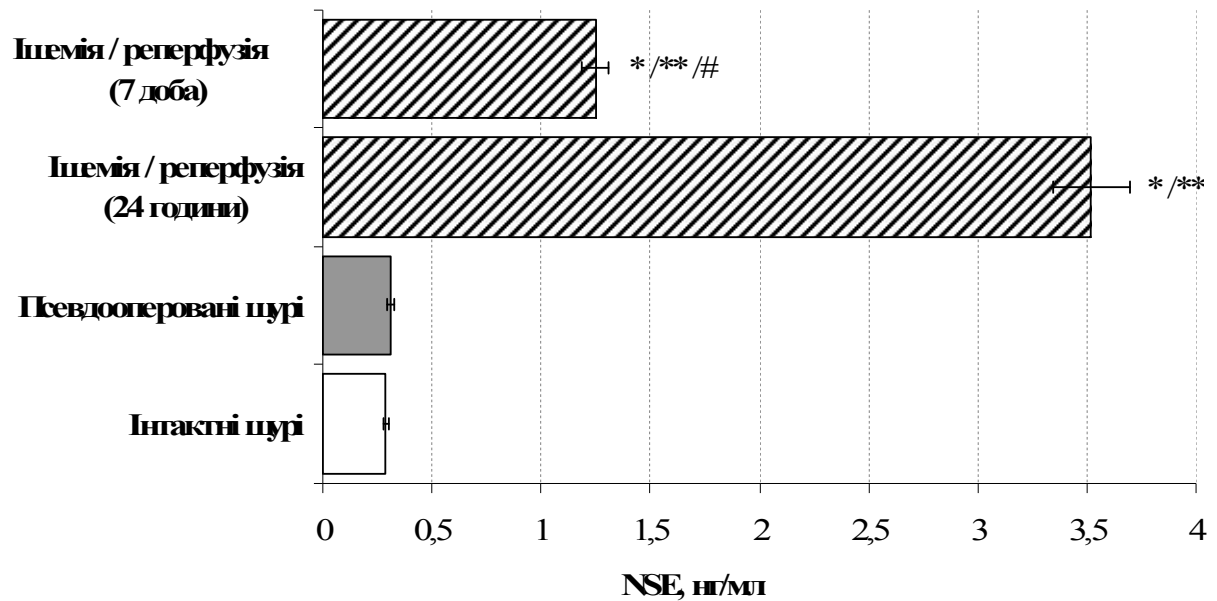


Рис. 3.1. Рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Тому на наступному етапі вплив модуляторів активності NMDA-рецепторів на рівень NSE в сироватці крові оцінювався через 24 години після постреперфузійного ураження зорового аналізатору. З цією метою були застосовані фармакологічні блокатори різних сайтів NMDA-рецепторів – блокатор фенциклідинового сайту мемантин, блокатор поліамінового сайту амантадину сульфат, блокатор іонного каналу магнію сульфат. Досліджувані засоби вводили одноразово в лікувальному режимі - через 30 хвилин після накладання ретробульбарної лігатури, в подальшому - 1 раз на добу. Спочатку був проведений етап скринінгу із застосуванням препаратів у дозах, які були апробовані у щурів при різних патологічних процесах у мозку і визнані достатніми для блокування активності NMDA-рецепторів (див. розділ 2). Згідно рекомендацій з доклінічної оцінки сполук з цито- та органопротекторною активністю при скринінгу умовно-ефективної дози необхідно провести дослідження у діапазоні доз, що є в 1,5-2 рази вищими та

нижчими від дози, для котрої вперше встановлений максимальний захисний ефект [3].

Спочатку був вивчений вплив мемантину у дозах 10, 20 та 40 мг/кг в/шл на динаміку нейроретинодеструкції за рівнем NSE в сироватці крові. Встановлено, що терапевтичне застосування в умовах ІР ока мемантину в усіх досліджуваних дозах сприяло деескалації активності NSE, однак ступінь її зниження був виражений по-різному (табл. 3.1). Так, найбільший ефект спостерігався при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг – за цих умов у щурів з ІР станом на 1-шу добу рівень NSE був достовірно нижчим на 64,0 %. В той же час, при введенні мемантину в дозах 10 мг/кг та 40 мг/кг зниження сироваткового рівня NSE у щурів з ІР ока становило 25,6 % та 40,1 % відносно групи контрольної патології. Рівні NSE у щурів, що отримали 10 мг/кг та 40 мг/кг мемантину, залишились достовірно вищими на 106 % та 66,1 %, ніж у щурів, що отримали препарат у дозі 20 мг/кг.

Таблиця 3.1

Дозозалежний вплив мемантину на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові у щурів з моделлю ішемії-реперфузії ока (через 24 години)

Дослідні групи щурів		NSE, нг/мл (M±m)
1	Псевдооперовані щурі, n=6	0,31±0,013
2	ІР + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=6	3,52±0,15*
3	ІР + мемантин, 10 мг/кг в/ш, n=6	2,62±0,05 [#]
4	ІР + мемантин, 20 мг/кг в/ш, n=6	1,27±0,04 ^{#^}
5	ІР + мемантин, 40 мг/кг в/ш, n=6	2,11±0,01 ^{#^€}

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,01);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 (p<0,05).

Отже, застосування блокатору фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів мемантину зменшувало біохімічні ознаки ішемічної нейроретинодеструкції із найбільшим ефектом в дозі 20 мг/кг при в/шл введенні. Двократне підвищення, так само, як і зменшення удвічі умовно-ефективної дози мемантину не знайшло суттєвого позитивного відображення у послабленні нейродеструктивних явищ у гострий постреперфузійний період.

Далі був досліджений вплив амантадину сульфату у дозах 2,5, 5 та 10 мг/кг (при в/в введенні) на постреперфузійну альтерацію зорового аналізатора. Виявилось, що застосування амантадину сульфату справляло дозозалежний ефект на рівень NSE в сироватці крові у щурів з моделлю ІР ока (табл. 3.2). Найбільший нейроретинопротекторний ефект спостерігався при застосуванні амантадину сульфату у дозі 5 мг/кг – станом на 1-шу добу у щурів з ішемічним ураженням ока рівень NSE був достовірно нижчим на 83,5 % відносно щурів з контрольною патологією.

Таблиця 3.2

Дозозалежний вплив амантадину на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові у щурів з ішемією-реперфузією ока (через 24 години)

Дослідні групи щурів		NSE, нг/мл (M±m)
1	Псевдооперовані щурі, n=6	0,31±0,013
2	ІР + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=6	3,52±0,15*
3	ІР + амантадину сульфат, 2,5 мг/кг в/в, n=6	1,21±0,03*#
4	ІР + амантадину сульфат, 5 мг/кг в/в, n=6	0,58±0,06*#^
5	ІР + амантадину сульфат, 10 мг/кг в/в, n=6	2,12±0,01*#^€

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,01);
- ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05);
- € - достовірність відмінностей відносно групи 4 (p<0,05).

При введенні амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 10 мг/кг зниження сироваткового рівня NSE у щурів з ІР ока становило 65,6 % та 39,7 % відносно групи контрольної патології. Крім того, рівні NSE у щурів, що отримали 2,5 мг/кг та 10 мг/кг амантадину, виявились достовірно вищими на 108 % та 266 %, ніж у щурів, що отримали препарат у дозі 5 мг/кг. Таким чином, найбільш потужний нейроцитопротекторний ефект на нейрональні шари сітківки та клітини зорового нерву у щурів з ішемічним ураженням ока справляло застосування блокатору поліамінового сайту NMDA-рецепторів амантадину умовно-ефективною дозою 5 мг/кг довенно, але й введення препарату в дозі 2,5 мг/кг також виявилось досить дієвим.

На останньому етапі була проведена оцінка впливу магнію сульфату у дозах 150, 250 та 350 мг/кг (при в/в введенні) на постреперфузійну альтерацію зорового аналізатора у гострий період. Встановлено, що застосування магнію сульфату, як і інших вищезгаданих блокаторів NMDA-рецепторів, також справляло дозозалежний ефект на рівень NSE в сироватці крові у щурів з моделлю ІР ока (табл. 3.3). Найбільш значуще ескалацію сироваткового рівня NSE у постреперфузійний період стримувало довенне введення магнію сульфату у дозі 250 мг/кг, в той час як застосування препарату в нижчій та вищій дозах було менш ефективним. Так, рівень NSE у щурів з ІР ока, що отримали магній сульфат в дозі 250 мг/кг був на 66,0 % нижчим, ніж в групі контрольної патології. За цих умов, рівень NSE у щурів, що отримали препарат у дозі 150 мг/кг, був достовірно нижчим на 19,6 %, ніж у щурів в групі ІР+0,9% NaCl. Також, рівень NSE у щурів в групі ІР+магнію сульфат 150 мг/кг виявився на 136 % вищими, ніж у щурів в групі ІР + магнію сульфат 250 мг/кг. Збільшення дози магнію сульфату до 350 мг/кг не викликало приросту нейропротективного ефекту і навіть зменшувало його. Зокрема, За цих умов, рівень NSE у щурів, що отримали препарат у дозі 350 мг/кг, був достовірно нижчим на 59,1 %, ніж у щурів з контрольною патологією, і невірогідно вищим, ніж у щурів в групі ІР+магнію сульфат 250 мг/кг. Таким чином, умовно-ефективною

нейроцитопротективною дозою для розчину магнію сульфату серед усіх проскрінованих доз слід вважати 250 мг/кг в/в.

Таблиця 3.3

Дозозалежний вплив магнію сульфату на рівень нейронспецифічної енолази в сироватці крові у щурів з ішемією/ реперфузією ока через 24 години

Дослідні групи щурів		NSE, нг/мл (M±m)
1	Псевдооперовані щурі, n=6	0,31±0,013
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=6	3,52±0,15*
3	IP + магнію сульфат, 150 мг/кг в/в, n=6	2,83±0,05*#
4	IP + магнію сульфат, 250 мг/кг в/в, n=6	1,20±0,12*#^
5	IP + магнію сульфат, 350 мг/кг в/в, n=6	1,44±0,10*#^

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,01);
- ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05);
4. відмінності між групами 4 та 5 недостовірні (p>0,05).

Наступним кроком було проведення порівняльної оцінки нейроцитопротективного ефекту фармакологічних блокаторів NMDA-рецепторів за показниками відносної динаміки рівня NSE в сироватці крові. Проводячи порівняльну оцінку цитопротекторної ефективності різних доз мемантину, амантадину та магнію сульфату (рис. 3.2), ми дійшли висновку, що найбільш потужну захисну дію на цілісність мембран нейронів сітківки та зорового нерву на тлі IP ока продемонструвала терапія розчином амантадину сульфату (5 мг/кг в/в). За спроможністю знижувати активність NSE в умовах даної патології застосування розчину амантадину сульфату перевершує введення в умовно-ефективних дозах мемантину або розчину магнію сульфату в середньому у 2,2 рази. Серед досліджуваних препаратів в умовно-ефективних дозах найменша ефективність була у магнію сульфату.

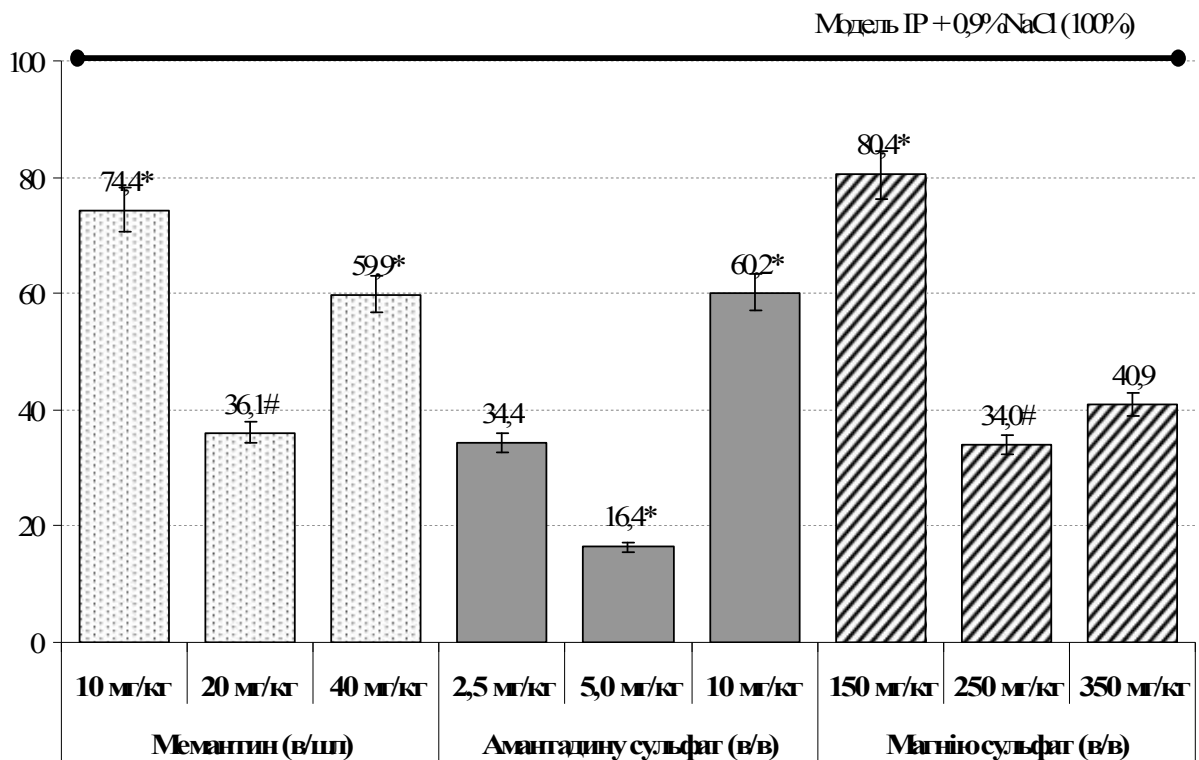


Рис. 3.2. Відносна динаміка сироваткового рівня NSE у щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока під впливом блокторів NMDA-рецепторів станом через 24 години (n=6, M±m). Рівень показника в групі IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія) прийнято за 100%; достовірність відмінностей щодо групи мемантин 20 мг/кг - * (p<0,05); достовірність відмінностей динаміки рівня NSE в групах мемантин 20 мг/кг та магнію сульфат 250 мг/кг щодо групи амантадину сульфат 5 мг/кг - # (p<0,05).

Таким чином, скринінгове дослідження цитопротекторних властивостей модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні зорового аналізатора за ступенем деескалації рівня маркера нейродеструкції NSE в гострому періоді дозволило виявити найбільш ефективний нейроретинопротектор. Порівнюючи вплив фармакологічних блокторів NMDA-рецепторів в умовно ефективних дозах на ступінь деескалації рівня NSE досліджувані препарати можна розташувати

наступним чином - амантадина сульфат (5 мг/кг в/в) > мемантин (20 мг/кг в/шл) > магнію сульфат (250 мг/кг в/в).

3.2 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопрولیферативної активності сітківки за ішемічного ураження зорового аналізатору у щурів

Дослідження рівня білка S100 в сироватці крові інтактних щурів, псевдооперованих щурів та щурів з моделлю ІР зорового аналізатору у різні терміни досліду виявило достовірні міжгрупові відмінності (рис. 3.3). У інтактних щурів рівень білка S100 в сироватці крові був низьким і в середньому становив 0,415 (Me; 95% ДІ 0,383-0,415) нг/мл. Накладання ретробульбарних лігатур без послідуєчого затягування не викликало суттєвих змін сироваткового рівня цього біохімічного маркера нейроапоптозу та нейрогліопрولیферативної активності. Зокрема, рівень білка S100 у псевдооперованих тварин становив 0,452 (95% ДІ 0,398-0,518) нг/мл і відповідав такому у інтактних тварин. Моніторинг рівня білка S100 у щурів з моделлю ІР засвідчив прогресування біохімічних ознак нейродегенеративних та проліферативних процесів в сітківці ока. А вже 60-хвилинне накладання ретробульбарної лігатури зумовило значуще підвищення рівня білка S100 в сироватці крові через 24 години – до 8,47 (95% ДІ 6,31-9,96) нг/мл, що перевищувало показники у інтактних та псевдооперованих тварин в 18-20 разів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,90$, $p=0,002$). Дослідження рівня білка S100 в сироватці крові через 7 діб після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури засвідчило істотне поглиблення постішемічних нейродегенеративних процесів в сітківці ока та зоровому нерві. Так, рівень показника у дослідних щурів з моделлю ІР на 7-му добу становив 14,7 (95% ДІ 11,1-17,9) нг/мл і був вищим в 32,6 рази, ніж у псевдооперованих щурів і

вищим в 1,73 рази, ніж у гострому постреперфузійному періоді (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,88$, $p=0,002$). Високий рівень білка S100 в сироватці крові щурів через тиждень після реперфузії ока може бути наслідком дисбалансу механізмів вторинної альтерації, проліферативних та репаративних процесів в сітківці ока. Очевидно, що ефективність нейроретинопротекції може визначатись здатністю фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів стримувати ескалацію білка S100 упродовж першого тижня після ішемічного ураження зорового аналізатору.

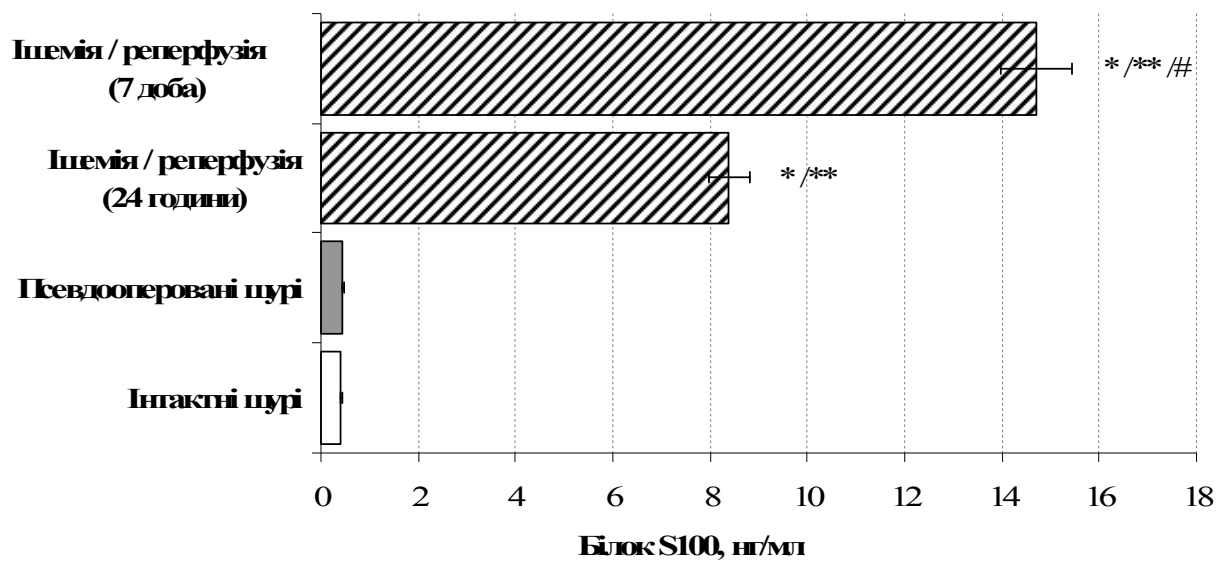


Рис. 3.3. Рівень білка S100 в сироватці крові щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,005$); псевдооперовані - ** ($p < 0,005$); ішемія/реперфузія 24 години - # ($p < 0,005$).

Встановлено, що застосування в умовах модельної ІР ока блокаторів NMDA-рецепторів (мемантину, амантадину сульфату, магнію сульфату) в умовно ефективних дозах забезпечувало деескалацію рівня білка S100 станом на 7-му добу, однак ступінь зниження показника суттєво відрізнявся (табл. 3.4). Так, застосування мемантину дозою 20 мг/кг в/ш перешкоджало ескалації рівня білка S100 відносно фонових значень: рівень показника був нижчим в 2,88 рази порівняно із таким у щурів групи контрольної патології.

Введення магнію сульфату 250 мг/кг в/в також перешкоджало зростанню рівня білка S100 на 7-му добу постреперфузійного ураження зорового аналізатора: вказаний маркер був достовірно нижчим в 3,24 рази порівняно з таким в групі контрольної патології.

Однак, найбільш виразний нейроретинопротекторний та антипроліферативний ефект справляло введення амантадину сульфату 5 мг/кг в/в, адже у щурів цієї групи рівень білка S100 був нижчим в 13,1 рази, ніж у щурів в групі контрольної патології, а також в 4,53 та 4,04 рази нижчим, ніж у щурів, що отримали мемантин 20 мг/кг в/шл та магнію сульфат 250 мг/кг в/в, відповідно.

Таблиця 3.4

Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на рівень білка S100 в сироватці крові щурів з моделлю ішемії / реперфузії ока на 7-му добу терапії

Дослідні групи щурів		Білок S100, нг/мл (M±m)
1	Псевдооперовані щури, n=5	0,45±0,01
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=5	14,78±0,83*
3	IP + мемантин, n=5	5,12±0,07*#
4	IP + амантадину сульфат, n=5	1,13±0,04*#^
5	IP + магнію сульфат, n=5	4,56±0,36*#€

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,01);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 (p<0,05).

Отже, застосування фармакологічного блокатору поліамінового сайту справляло більший коригувальний ефект на нейродегенеративні процеси в сітківці ока, ніж застосування блокатору фенциклідинового сайту та блокатору іонного каналу.

Додаткові докази закономірностей, виявлених при біохімічному дослідженні, були отримані на підставі аналізу результатів протокової ДНК-цитометрії клітин сітківки. Як відомо, ішемічно-реперфузійне ураження будь-яких тканин, в тому числі сітківки та зорового нерву, реалізується через розвиток некрозу та апоптозу, із наступним заміщенням вогнища деструкції за рахунок інтенсивного поділу сполучно-тканинних гліальних елементів. В наслідок ішемії/реперфузії в сітківці та зоровому нерві формується вогнище деструктивно-дегенеративних змін, що є гетерогенним, без чіткого розмежування некротичних та апоптотичних процесів. Між тим, саме співвідношення некроз/апоптоз щодо загиблих клітинних елементів може детермінувати перебіг репараційних та проліферативних процесів в сітківці у перспективі. Про питому вагу апоптозу в окреслених патоморфологічних змінах сітківки у постреперфузійний період можна судити за зростанням кількості клітинних елементів, які перебувають у фазі SUB-G0G1. Клітини у фазі SUB-G0G1 мають ознаки фрагментації ДНК, що анонсує апоптоз.

Результати наших досліджень засвідчили, що вже наприкінці першої доби постреперфузійного періоду спостерігалось підвищення кількості ретинальних клітин з ознаками апоптозу (рис. 3.5). Свідченням цього є збільшення відсоткового співвідношення клітин у фазі SUB-G0G1 у зразках суспензії сітківки щурів з моделлю IP зорового аналізатора. Так, у інтактних та псевдооперованих щурів відсоток клітин у фазі SUB-G0G1 становив 0,46 (Me; 95% CI 0,28-0,69) % та 0,49 (Me; 95% CI 0,29-0,71) %. В той же час, у щурів з моделлю IP ока через 24 години відсоток клітин в фазі SUB-G0G1 становив 9,91 (Me; 95% CI 5,29-16,1) %, що було достовірно вищим в 20-21 рази, ніж у інтактних та псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$).

Станом на 7-му добу у щурів з IP ока частка клітин в фазі SUB-G0G1 становила 7,25 (Me; 95% CI 5,11-13,9) %, що було нижчим в 1,37 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=1,08$, $p=0,31$), але

залишалось значимо вищим (в 14,8 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$).

Здатність модуляторів NMDA-рецепторів впливати на механізми загибелі нейроретиноцитів у гострому періоді може детермінувати перебіг ремоделювання ушкоджених структур зорового аналізатора в подальшому.

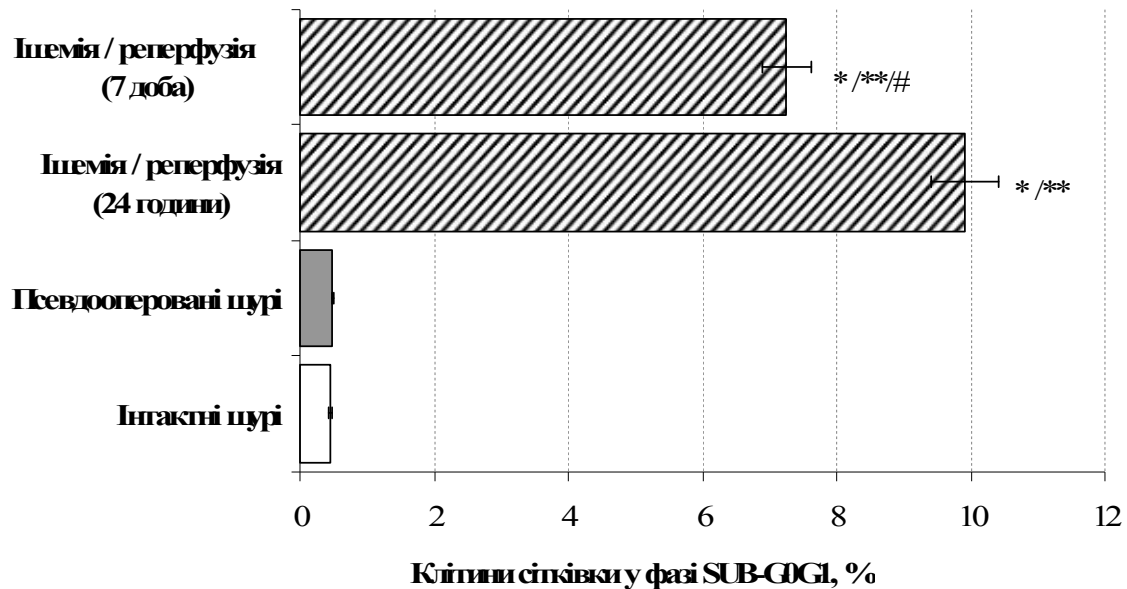


Рис. 3.4. Відносна кількість клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 у щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/ реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Тому на наступному етапі була проведена порівняльна оцінка впливу мемантину, адамантану сульфату та магнію сульфату на показники фази SUB-G0G1 клітинного циклу сітківки. Виявилось, що всі досліджувані блокатори NMDA-рецепторів у застосованих дозах сприяли зменшенню відносної кількості ретиноцитів, які перебувають фазі SUB-G0G1 клітинного циклу, однак ступінь зниження даного показника істотно відрізнявся залежно від застосованого препарату (табл. 3.5). Реалізацію найбільш потужного антиапоптотичного ефекту на клітини сітківки забезпечувало застосування амантадину сульфату дозою 5 мг/кг. Так, в/в введення вказаного інгібітору

поліамінового сайту NMDA-рецепторів супроводжувалось вірогідним зменшенням питомої ваги клітин з ознаками фрагментації ДНК в середньому в 3,38 рази відносно групи контрольної патології. Разом із цим, застосування магнію сульфату (250 мг/кг в/в), або мемантину (20 мг/кг в/шл) призводило до зменшення відсотку клітин, які перебувають у фазі SUB-G0G1, відносно цього ж показника групи контрольної патології, у середньому в 2,57 та 1,62 рази, відповідно. Зауважимо, що застосування магнію сульфату виявилось більш ефективним за мемантин в середньому в 1,32 рази, однак обидва препарати значимо поступались антиапоптотичному ефекту амантадину сульфату в середньому на 24,1 та 52,0 % відповідно. За антиапоптотичною активністю досліджувані інгібітори NMDA-рецепторів можна розмістити в наступній послідовності: амантадину сульфат (5 мг/кг в/в) > магнію сульфат (250 мг/кг в/в) > мемантин (20 мг/кг в/ш).

Таблиця 3.5

Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на фрагментацію ядерної ДНК (апоптотичну активність) клітин сітківки у щурів з моделлю ішемії / реперфузії ока станом на 24 години

Дослідні групи щурів		Відносна кількість клітин (у %), що перебувають у фазі SUB-G0G1 (M±m)
1	Псевдооперовані щурі, n=7	0,49±0,06
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=7	9,91±1,44*
3	IP + мемантин, n=7	6,11±0,61*#
4	IP + амантадину сульфат, n=7	2,93±0,14*#^
5	IP + магнію сульфат, n=7	3,86±0,43*#^€

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 (p<0,05).

Відомо, що у постреперфузійний період ока, інтенсифікація реплікаційної спроможності ядерної ДНК ретинальних клітин є закономірною патоморфофункціональною відповіддю тканини на альтерацію внаслідок некротичних або апоптотичних процесів. Підвищення проліферативної активності в нейрогенних структурах зорового аналізатора здебільшого відбувається за рахунок поділу нейроглії. Про збільшення активності нейрогліального пулу може свідчити підвищення відсоткового співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) у зразках суспензії сітківки щурів з моделлю ІР ока.

Встановлено, що вже наприкінці першої доби постреперфузійного періоду відмічалось наростання проліферативної активності ретинальних клітин (рис. 3.5). Так, у інтактних та псевдооперованих щурів відсоток клітин у фазі S в середньому становив 0,12 (Me; 95% CI 0,09-0,18) % та 0,13 (Me; 95% CI 0,10-0,19) %. В той же час, у щурів з моделлю ІР ока через 24 години відсоток клітин в фазі S становив 0,92 (Me; 95% CI 0,49-1,63) %, що було достовірно вищим в 7 - 8 рази, ніж у інтактних та псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,87$, $p=0,002$).

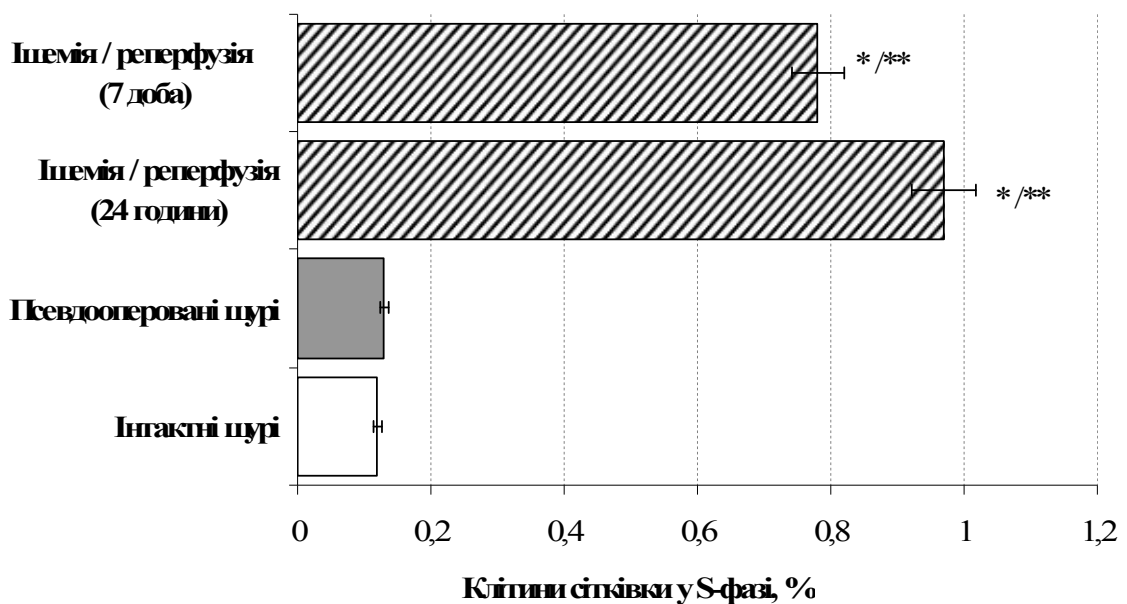


Рис. 3.5. Відносна кількість клітин сітківки у фазі S у щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,01$); псевдооперовані - ** ($p < 0,01$); ішемія/ реперфузія 24 години - $p > 0,05$.

Станом на 7-му добу у щурів з ІР ока частка клітин в фазі S становила 0,78 (Me; 95% CI 0,44-0,90) %, що було недостовірно нижчим в 1,15 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=1,34$, $p=0,209$), але залишалось значимо вищим (в 6,0 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$).

Відомо, що сітківка не спроможна регенерувати за рахунок спеціалізованих клітин, а поділ відбувається лише за рахунок нейрогліальних елементів. Інтенсифікація фази S клітинного циклу характеризує початок заміщення зруйнованих клітин сітківки, зокрема нейрональних, на сполучнотканинні (нейрогліальні) елементи. Здатність модуляторів NMDA-рецепторів впливати на даний процес у гострому періоді може детермінувати напрямок ремоделювання ушкоджених структур зорового аналізатора в подальшому. Тому на наступному етапі була проведена порівняльна оцінка впливу мемантину, адамантану сульфату та магнію сульфату на показники фази S клітинного циклу сітківки.

Встановлено, що застосування в умовах модельної ІР ока блокаторів NMDA-рецепторів (мемантину, амантадину сульфату, магнію сульфату) в умовно ефективних дозах забезпечувало пригнічення надмірної проліферативної активності нейрогліальних елементів сітківки (табл. 3.5). Введення мемантину дозою 20 мг/кг в/ш перешкоджало зростанню кількості клітин сітківки, що перебували у фазі S: частка таких клітин була нижчою в 1,54 рази порівняно із таким у щурів групи контрольної патології. Введення магнію сульфату 250 мг/кг в/в також перешкоджало зростанню проліферативної активності сітківки у гострому періоді ІР: відносна кількість клітин у фазі S була достовірно нижчою в 2,42 рази порівняно з показником в групі контрольної патології.

Зауважимо, що найбільш виразний антипроліферативний ефект був засвідчений у амантадину сульфату дозою 5 мг/кг в/в. У щурів цієї групи частка клітин у фазі S була в нижчою в 3,03 рази, ніж у щурів в групі IP + 0,9% NaCl, а також в 1,97 рази нижчою, ніж у щурів, що отримали мемантин дозою 20 мг/кг в/шл, відповідно.

Таблиця 3.6

Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на активність проліферативної фази S клітин сітківки щурів з моделлю ішемії / реперфузії ока станом на 24 годину

Дослідні групи щурів		Відносна кількість клітин (у %), що перебувають у фазі S (M±m)
1	Псевдооперовані щурі, n=7	0,13±0,01
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=7	0,97±0,15*
3	IP + мемантин, n=7	0,63±0,12*#
4	IP + амантадину сульфат, n=7	0,32±0,07*#^
5	IP + магнію сульфат, n=7	0,40±0,05*#

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,01$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 ($p < 0,05$).

Таким чином, ішемічно-реперфузійне ураження зорового аналізатора у щурів характеризується значущим зростанням рівня білку S100 в сироватці крові, цитометричних ознак активації апоптичної загибелі ретиноцитів (із багаторазовим приростом кількості клітин у фазі SUB-G0G1), посиленням нейрогліопрولیферативних процесів (із збільшенням кількості клітин у фазі S). Результати оцінки ефективності досліджуваної лінійки модуляторів активності NMDA-рецепторів продемонстрували лідерство амантадину

сульфату за величиною цитопротективного ефекту при ураженні зорового аналізатора ішемічного генезу. Достатній нейроретинопротекторний потенціал також був виявлений у мемантину за вказаних умов. Тому, для нової експериментальної серії, присвяченій встановленню наявності у модуляторів активності NMDA-рецепторів захисного впливу на сітківку в умовах контузії ока, обрано саме ці два лікарські засоби.

3.3 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази, білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопрولیферативної активності сітківки за травматичного ураження ока у кролів

Для дослідження нейроретинопротекторного потенціалу модуляторів NMDA-рецепторів за травматичного ушкодження зорового аналізатора була обрана модель стандартизованої контузії ока у кролів. Контузіїю ока у кролів викликали за допомогою дії вуглекислого газу під тиском, який створювали за допомогою холостого пострілу з пневматичного пістолету впритул до центру рогівки ока (див. розділ 2). Пряма зовнішня травма очного яблука, що викликається високошвидкісним ударом, як правило супроводжується порушенням гемодинаміки та гідродинаміки ока, геморагіями, масивною альтерацією та некробіотичними змінами в тканинах ока, розвитком нейроретинопатії у посттравматичному періоді.

Дослідження біохімічних маркерів нейроретинодеструкції – рівнів NSE та білка S100 у дослідних тварин з травматичним ушкодженням зорового аналізатора засвідчило їх значне підвищення у гострому та підгострому постконтузійному періоді із певними особливостями (рис. 3.6). Так, через 24 години після моделювання патології, у дослідних кролів рівень NSE (маркеру мембранної цілісності нейронів) був достовірно вищим в 43,4 рази, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$; критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3$). У гострий постконтузійний період подібне зростання рівня NSE вказує на

розвиток суттєвої деструкції нейронів гангліозних шарів сітківки (нейронекроз), що є тотожним із ситуацією, яка мала місце при модельній ІР ока у щурів. Станом на 7-му добу постконтузійного ураження ока рівень NSE залишався вищим в 42,3 рази, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$), що може свідчити про персистенцію інтенсивних некробіотичних процесів в нейрональних клітинних елементах сітківки та зорового нерва.

Травматичне ушкодження зорового аналізатору характеризувалось достовірним підвищенням рівня білка S100 в сироватці крові у гострому періоді (в 20,5 рази) із подальшим значущим зростанням на 7-у добу постконтузійного періоду - в 38,8 рази відносно інтактних тварин та в 1,92 рази відносно стану на 1-у добу. Така динаміка білка S100 свідчить про активацію нейрогліальних елементів спочатку у відповідь на необоротну первинну альтерацію із подальшим прогресуванням проліферативних процесів в сітківці на тлі вторинної альтерації, гемодинамічних й гідродинамічних порушень.

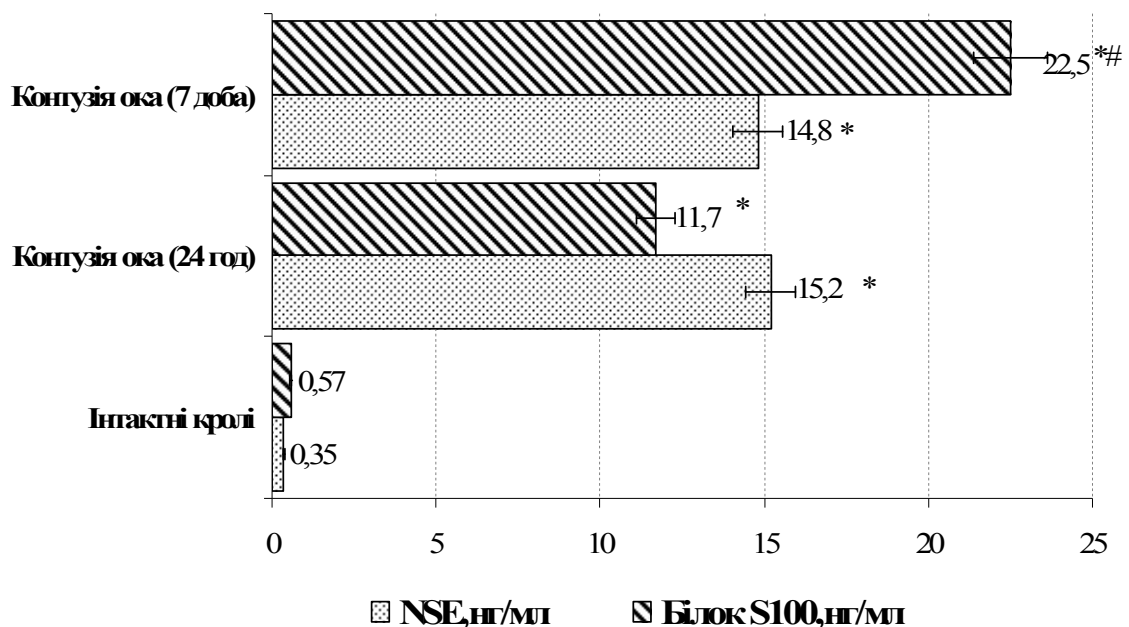


Рис. 3.6. Рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові кролів з модельною контузією ока ($n=8$, $M \pm m$). Достовірність

відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години - # ($p < 0,05$).

На моделі постреперфузійного ушкодження зорового аналізатора було встановлено, що достатній й практично співставний за виразністю терапевтичний ефект за біохімічними та цитометричними критеріями забезпечувало застосування мемантину в дозі 20 мг/кг в/шл та амантадину сульфату в дозі 2,5 мг/кг в/в, однак найкращій нейроретинопротекторний ефект викликало застосування амантадину сульфат в дозі 5 мг/кг в/в. Тому вплив блокаторів NMDA-рецепторів на перебіг контузійного ураження зорового аналізатора був досліджений із застосуванням всіх вказаних доз.

Встановлено, що терапевтичне застосування в умовах контузії ока блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів сприяло деескалації рівня NSE із певними особливостями (табл. 3.7). Так, найменший ефект спостерігався при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг – за цих умов у тварин з контузією ока станом на 1-шу добу рівень NSE був достовірно нижчим на 37,3 %, ніж в групі контрольної патології.

Таблиця 3.7

Вплив мемантину та амантадину на рівень нейрон-специфічної енолази в сироватці крові кролів через 24 години після модельної контузії ока

Дослідні групи кролів		NSE, нг/мл (M±m)
1	Інтактні кролі, n=8	0,35±0,01
2	Контузія + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=8	15,2±0,26*
3	Контузія + мемантин, n=8	9,53±0,11*#
4	Контузія + амантадину сульфат, n=8	8,03±0,21*#^
5	Контузія + амантадину сульфат, n=8	7,27±0,18*#^€

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,001$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,01$);

3. [^] - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);

4. [€] - достовірність відмінностей відносно групи 4 ($p < 0,05$).

При введенні амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг зниження рівня NSE у кролів з контузією ока становило 47,2 % та 52,2 % відносно групи контрольної патології. Зауважимо, що рівень NSE у кролів, що отримали амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг виявився достовірно нижчим на 15,7 % та 23,7 %, ніж у кролів, що отримали мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл.

Таким чином, у гострому періоді травматичного ушкодження зорового аналізатора блокатор поліамінового сайту достовірно перевершував блокатор фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів за здатністю перешкоджати альтераційним процесам в сітківці та зоровому нерві, що супроводжуються вивільненням NSE з нейронів гангліозного шару сітківки і промотують некробіоз ушкоджених структур.

Далі було досліджено вплив мемантину та амантадину сульфату на рівень білка S100 станом на 7-му добу, тобто у термін із найвищими значеннями цього модулятора проліферативних процесів гліальних елементів сітківки. Встановлено, що при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг в/шл за цих умов у тварин з контузією ока станом на 7-му добу рівень білка S100 в сироватці крові був достовірно нижчим на 34,7 %, ніж в групі контрольної патології (табл. 3.8). При введенні амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в зниження рівня білка S100 у кролів з контузією ока становило 42,7 % та 48,0 % відносно кролів групи контрольної патології, яким в якості терапії вводили 0,9% розчин NaCl. Також рівень білка S100 у кролів, що отримували амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в, виявився достовірно нижчим на 12,2 % та 20,4 %, ніж у кролів, що отримували мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл.

Отже, у відтермінованому періоді травматичного ушкодження зорового аналізатора блокатор поліамінового сайту достовірно перевершував блокатор фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів за здатністю викликати

деескалацію білка S100, що експресується гліоцитами у відповідь на некротичні та запальні зміни. Це свідчить про більш значущий блокувальний ефект амантадину сульфату щодо прогресування проліферативних процесів в сітківці ока порівняно з таким у мемантину.

Таблиця 3.8

Вплив мемантину та амантадину сульфату на рівень білка S100 в сироватці крові кролів з контузією ока на 7-му добу терапії

Дослідні групи кролів		Білок S 100, нг/мл (M±m)
1	Інтактні кролі, n=8	0,57±0,03
2	Контузія + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=8	22,5±0,77*
3	Контузія + мемантин, n=8	14,7±0,16*#
4	Контузія + амантадину сульфат, n=8	12,9±0,27*#^
5	Контузія + амантадину сульфат, n=8	11,7±0,24*#^€

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,001$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,01$);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 ($p < 0,05$).

При травматичному ушкодженні зорового аналізатора загибель клітинних елементів сітківки у гострому періоді реалізується переважно шляхом некрозу. При цьому вивільнення із загиблих клітин прозапальних та проапоптичних медіаторів, в тому числі NSE, індукує процеси апоптозу в збережених клітинних елементах. Співвідношення процесів некроз /апоптоз є вагомим детермінантом перебігу травматичного ушкодження зорового аналізатора у постконтузійному періоді. Цитометрична оцінка апоптичної активності в сітківці ока у кролів із модельною контузією ока засвідчила достовірне підвищення пулу клітин, які перебували у фазі SUB-G0G1 у різні

терміни досліджу (рис. 3.7). Цей показник фрагментації ДНК у дослідних тварин через 24 години перевищував такий у інтактних тварин в 14,6 рази, а станом на 7-му добу – в 10 разів ($p < 0,01$; критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3$). Зауважимо, що станом на 7 добу відсоток клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 був нижчим, ніж станом на 1-шу добу після контузії ока, але ці відмінності не сягали межі вірогідності.

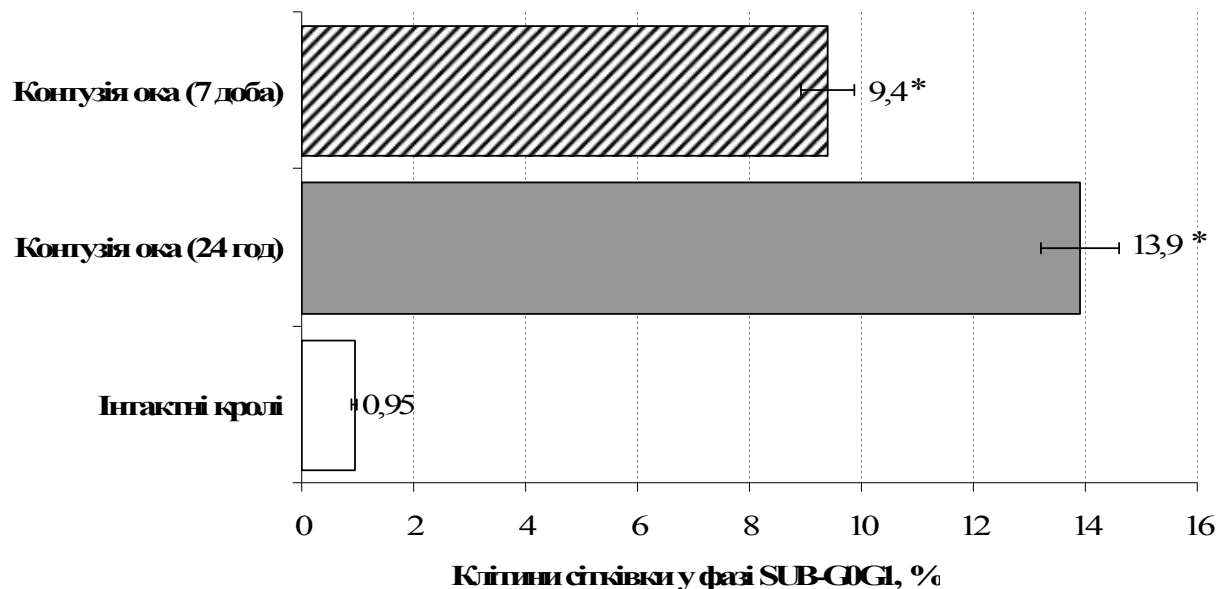


Рис. 3.7. Відносна кількість клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 у кролів з модельною контузією ока ($n=5$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно інтактних кролів - * ($p < 0,01$).

За результатами наших досліджень, що при застосуванні блокаторів NMDA-рецепторів активність процесу нейроретиноапоптозу достовірно знижувалась, однак виразність цього ефекту у блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів була різною (табл. 3.9). Так, при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг в/шл у тварин з контузією ока через 24 години відсоток клітин із ознаками фрагментації ДНК (у фазі SUB-G0G1) був достовірно нижчим на 25,1 %, ніж в групі контрольної патології. Введення амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в забезпечувало зниження частки клітин у фазі SUB-G0G1 у кролів з модельною контузією ока на 51,1

% та 60,3 % відносно кролів групи контрольної патології, яким в якості терапії вводили 0,9% розчин NaCl. Також частка клітин у фазі SUB-G0G1 у кролів, що отримували амантадину сульфат, в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг виявилась достовірно нижчою на 34,5 % та 46,9 %, ніж у кролів, що отримували мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл.

Таким чином, у гострому періоді травматичного ушкодження зорового аналізатора блокатор поліамінового сайту достовірно перевершував блокатор фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів за здатністю викликати деескалацію апоптичних явищ у сітківці ока, що забезпечує збереження більшої кількості функціонально активних ретиноцитів та вищу нейроретинопротективну ефективність порівняно з такою у мемантину.

Таблиця 3.9

Вплив мемантину та амантадину сульфату на фрагментацію ядерної ДНК (апоптичну активність) клітин сітківки кролів з контузією ока станом на 24 годину

Дослідні групи кролів		Відносна кількість клітин (у %), що перебувають у фазі SUB-G0G1 (M±m)
1	Інтактні кролі, n=5	0,95±0,07
2	Контузія + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=5	13,9±0,50*
3	Контузія + мемантин, 20 мг/кг в/ш, n=5	10,4±1,17*#
4	Контузія + амантадину сульфат, n=5	6,81±0,64*#^
5	Контузія + амантадину сульфат, n=5	5,52±0,31*#^

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,001$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
- ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
4. відмінності між групами 4 та 5 відповідають $p = 0,1$.

Значне первинне ураження масиву нейронів сітківки за умов контузії ока супроводжувалось активацією проліферативних процесів. На користь подібного твердження свідчить достовірне збільшення відсоткового співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у суспензії тканини сітківки в середньому в 4,41 рази вже через 24 години після контузійної травми ока (рис. 3.8). Станом на 7-му добу реєструвалось ще більш значуще наростання проліферативної активності клітин сітківки, що головним чином реалізується за рахунок нейрогліальних та сполучнотканинних елементів. Так, частка клітин у фазі S на 7-му добу після травми була достовірно вищою в 1,75 рази, ніж станом на 1-шу добу.

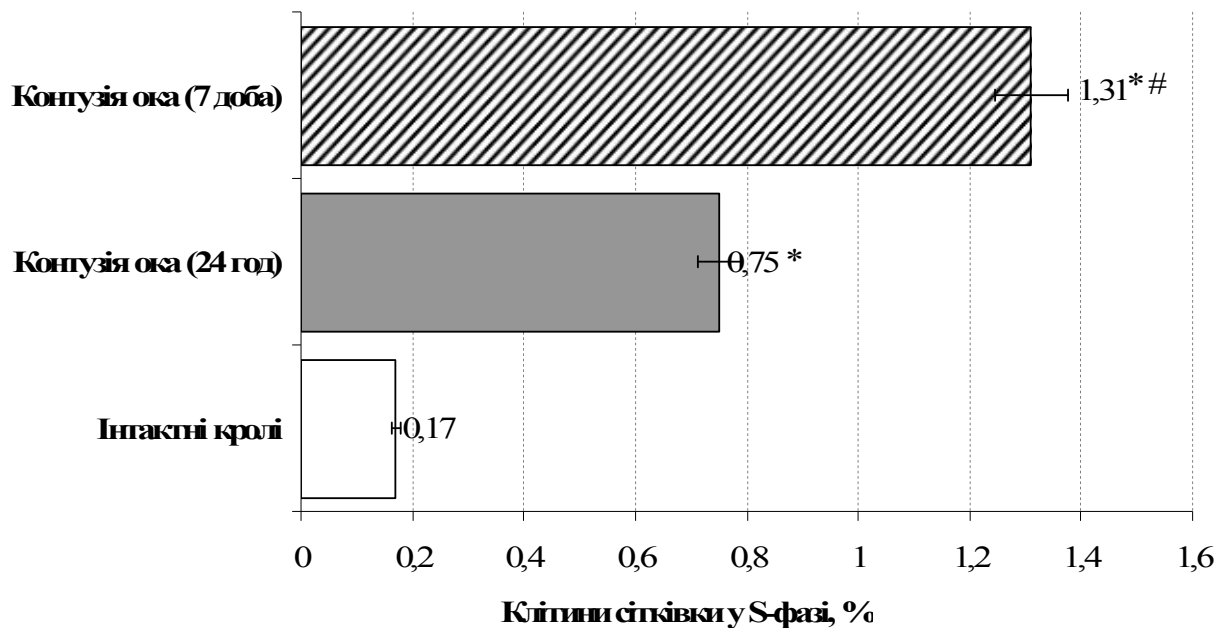


Рис. 3.8. Відносна кількість клітин сітківки у фазі S у кролів з модельною контузією ока ($n=5$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно інтактних кролів - * ($p < 0,01$; критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3$).

Виявилось, що фармакологічне блокування активності NMDA-рецепторів через поліаміновий чи фенциклідиновий сайти забезпечувало достовірне пригнічення проліферативної активності сітківки за контузійної травми ока у кролів (табл. 3.10, рис. 3.9). При застосуванні мемантину у дозі

20 мг/кг в/шл у тварин з контузією ока через 24 години відсоток клітин із ознаками реплікації ДНК (у фазі S) був достовірно нижчим на 25,3 %, ніж в групі контрольної патології. Введення амантадину сульфату в дозах 2,5 та 5 мг/кг в/в забезпечувало зниження частки клітин у фазі S у кролів з контузією ока на 44,0 % та 58,7 % відносно кролів групи контрольної патології. Також частка клітин у фазі S у кролів, що отримували амантадину сульфат, в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг виявилась достовірно нижчою на 25,0 % та 44,6 %, ніж у кролів, що отримували мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл.

Таким чином, антиапоптотичні та антипроліферативні властивості модуляторів NMDA-рецепторів амантадину сульфату та мемантину реалізувались і за умов модельної контузії ока у кролів, що засвідчили зміни відповідних біохімічних та цитометричних маркерів.

Таблиця 3.10

Вплив мемантину та амантадину сульфату на активність проліферативної фази S клітин сітківки кролів з контузією ока станом на 24 годину

Дослідні групи кролів		Відносна кількість клітин (у %), що перебувають у фазі S (M±m)
1	Інтактні кролі, n=5	0,17±0,07
2	Контузія + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=5	0,75±0,07*
3	Контузія + мемантин, n=5	0,56±0,05*#
4	Контузія + амантадину сульфат, n=5	0,42±0,04*#^
5	Контузія + амантадину сульфат, n=5	0,31±0,04*#^

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,01$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
4. відмінності між групами 4 та 5 відповідають $p = 0,1$.

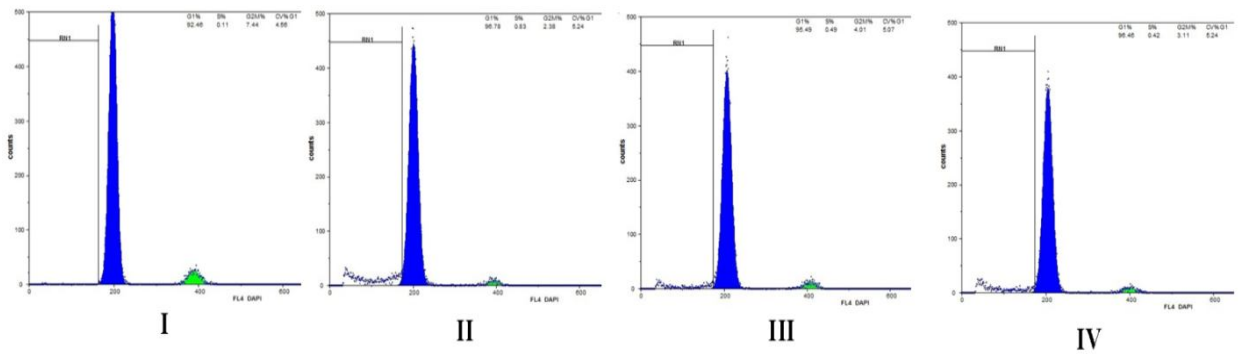


Рис. 3.9. Приклад ДНК-гістограм ядерної суспензій клітин сітківки інтактного кроля (I) та кролів із контузією ока, які отримували: II – 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія), III – розчин амантадину сульфату дозою 5 мг/кг в/в та IV – мемантин 20 мг/кг в/ш.

3.4 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на мікроциркуляцію сітківки за ішемічного та травматичного ураження ока у тварин

Відомо, що застосування в постконтузійний, або постреперфузійний період ураження зорового аналізатора засобів, які спроможні відновлювати та покращувати перфузію ока, є перспективним направленням сучасної нейроретинопротекції. Саме тому, зважаючи на результати попередніх досліджень було доцільним, використовуючи метод лазерної доплерографії у гострий постреперфузійний період ретинальної ішемії у щурів та контузійної травми ока у кролів дослідити вплив блокаторів NMDA-рецепторів на повноту відновлення кровоплину в судинах мікроциркуляторного русла басейну *a. ophthalmica*.

Проведене дослідження показало, що маніпуляції на оці з приводу накладання ретробульбарних лігатур без їх послідуєчого затягування не призвели до змін коефіцієнту мікроциркуляції у псевдооперованих тварин, які зіставлялись з фоновими рівнями показника у щурів дослідних груп. Після моделювання патології шляхом лігування судинно-нервового пучка очного яблука, перфузія в задньому полюсі ока щурів групи контрольної

патології знизилась відносно фонових значень в середньому в 39,2 рази, $p < 0,05$ (табл. 3.11).

Показники мікроциркуляції у щурів, розподілених по групам відповідно до запланованої терапії модуляторами NMDA-рецепторів - мемантином, амантадином, магнієм сульфатом, були вірогідно меншими порівняно із вихідними значеннями в середньому в 37,2, 38,5 та 36,9 рази. У групі контрольної патології, 3-годинний постреканалізаційний період супроводжувався суттєвою гіперперфузією, що свідчить про формування синдрому невідновленого кровоплину, адже коефіцієнт мікроциркуляції виявився достовірно меншим порівняно із його початковими значеннями у середньому в 3,3 рази.

Таблиця 3.11

Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюсу ока щурів після реперфузії а. *ophthalmica*

Дослідні групи щурів		Коефіцієнт мікроциркуляції, у.о. (M±m)		
		Фон	Ішемія	Реперфузія (3 години)
1	Псевдооперовані щурі, n=7	8603±56,9	-	-
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=7	8694±39,3	221,9±5,4*	2665±68,8*
3	IP + мемантин, n=7	8698±43,4	234,1±6,3*	4355±77,9*#
4	IP + амантадину сульфат, n=7	8721±39,2	226,3±3,2*	6738±40,1*#^
5	IP + магнію сульфат, n=7	8836±31,4	239,6±4,4*	4676±51,2*#€

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно «фону» ($p < 0,001$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,01$);
3. ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
4. € - достовірність відмінностей відносно групи 4 ($p < 0,05$).

Застосування модуляторів NMDA-рецепторів амортизувало погіршення кровопостачання ока, проте за своєю ефективністю (ступенем покращання перфузії) блокатори полімінового сайту, фенциклідинового сайту та іонного каналу достовірно відрізнялись. Так, за даними лазерної доплерографії, на тлі інфузії амантадину сульфату (5 мг/кг в/в) коефіцієнт мікроциркуляції у 2,5 рази перевищував аналогічний показник групи контрольної патології. Стимулювальна дія мемантину та розчину магнію сульфату на кровоплин у задньому полюсі ока була достеменно меншою за амантадину сульфат, і супроводжувалась зростанням досліджуваного показника відносно контрольної патології у середньому в 1,6 та 1,8 рази відповідно. Зауважимо, що за спроможністю покращувати мікроциркуляцію в тканинах ока у гострому постреперфузійному періоді, амантадину сульфату переважав мемантин та магнію сульфат в середньому 1,5 та 1,4 рази ($p < 0,05$).

На наступному етапі ми дослідили зміни мікроциркуляції за умов контузії ока у кролів. Перші 3 год після травми ока, індукованої потоком вуглекислого газу під тиском, характеризувались статистично значущою гіперперфузією ока, про що свідчить значне зниження коефіцієнта мікроциркуляції відносно фонових значень в середньому в 8,2 рази (табл. 3.12). Застосування мемантину у дозі 20 мг/кг в/шл та амантадину сульфату у дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в, відповідно, сприяло відновленню кровопостачання сітківки ока, про що свідчить зростання коефіцієнту мікроциркуляції відносно контрольної патології у середньому в 4,5, 6,3 та 7,0 рази, відповідно. Отже, амантадину сульфат в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг переважав мемантин за стимулювальним ефектом щодо мікроциркуляції в 1,28 та 1,55 рази, відповідно.

Покращання перфузії заднього полюсу очного яблука тварин з ішемічним чи травматичним ушкодженням зорового аналізатору на тлі застосування модуляторів активності NMDA-рецепторів, і в першу чергу блокаторів поліамінового сайту, може бути одним із вагомих механізмів нейроретинопротекторної дії. Очевидно, що мемантин та амантадину

сульфат нормалізують мікроциркуляцію опосередковано, через зменшення проявів глутаматної ексайтотоксичності, яка є ключовою патогенетичною ланкою у розвитку деструктивно-дегенеративних змін в гангліозних шарах сітківки.

Таблиця 3.12

Вплив мемантину та амантадину сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюсу ока кролів у гострий постконтузійний період

Дослідні групи кролів		Коефіцієнт мікроциркуляції, у.о. (M±m)	
		Фон	Травма (3 години)
1	Інтактні кролі, n=10	11289±210,4	-
2	Контузія + 0,9% NaCl (контрольна патологія), n=10	11396±218,6	1398±35,0*
3	Контузія + мемантин, n=10	10706±125,0	6344±130,4*#
4	Контузія + амантадину сульфат, n=10	10990±109,5	8868±128,9*#^
5	Контузія + амантадину сульфат, n=10	10987±107,6	9802±118,6*#^€

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,001$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
- ^ - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$);
- € - достовірність відмінностей відносно групи 4 ($p < 0,05$).

Не виключаються і інші механізми реалізації судинних ефектів модуляторів NMDA-рецепторів, адже мемантин може підвищувати позаклітинну концентрацію допаміну, інгібувати вивільнення ацетилхоліну, блокувати 5-гідрокситриптамінові рецептори третього типу (5-ГТ₃) венул ока [174], що може інтенсифікувати мікроциркуляцію, покращувати відтік венозної крові та зменшувати венозне повнокрів'я, створюючи умови для нормалізації мікроциркуляції в сітківці ока. Ці механізми можуть сприяти зменшенню набряку, який викликає стиснення судин зовні (особливо за умов

контузії ока), порушуючи тим самим кровоплин. Погіршення мікроциркуляції поряд із вивільненням медіаторів нейроретинодеструкції, в тому числі NSE та білка S100, буде поглиблювати вторинні альтеративні процеси в сітківці, потенціювати глутаматну ексайтотоксичність та суттєво модифікувати метаболічний статус зорового аналізатора. Тому актуальним є залишається встановлення метаботропного потенціалу модуляторів NMDA-рецепторів за умов ішемії/реперфузії та контузійної травми ока у кролів. Вирішенню цього завдання був присвячений наступний розділ нашого дослідження.

Висновки до розділу 3

1. Експериментальне ішемічне ураження зорового аналізатору у щурів асоціюється з підвищенням маркерів нейродеструкції в сироватці крові - NSE (на 1-шу та 7-му в 10,9 та 4,3 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (на 1-шу та 7-му добу - в 8,4 та 14,7 рази, $p < 0,001$). Травматичне ураження зорового аналізатора у кролів характеризується більш значущою ескалацією сироваткових рівнів NSE у вказані терміни (в 43,4 та 42,3 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (в 20,5 та 38,8 рази, $p < 0,001$) відносно інтактних тварин. За ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало дозозалежне зниження рівнів NSE (в 2-6 рази, $p < 0,05$) та білка S100 (в 2-3 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату.
2. Ішемічне ураження зорового аналізатору асоціюється з підвищенням рівня цитометричних маркерів апоптозу (клітин у фазі SUB-G0G1) та нейрогліопрولیферативної активності (клітин у фазі S) в 20,2 та 7,1 рази ($p < 0,001$) на 1-шу добу, в 14,8 та 6,0 рази ($p < 0,001$) на 7-му добу, відповідно. При травматичному ураженні зорового аналізатора у кролів частки клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 та у фазі S були вищими в 14,6 та 4,41 рази станом на 1-шу добу; в 10,0 та 7,70 разів - на 7-му добу ($p < 0,001$). За ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора введення модуляторів NMDA-

рецепторів викликало зниження часток клітин у фазі SUB-G0G1 (в 1,6-2,6 рази) та фазі S (в 1,5-3,0 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату.

3. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази, $p < 0,05$) мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді із максимальним ефектом у амантадину сульфату.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:

[14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 33, 35, 36, 37]

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ
В СІТКІВЦІ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІШЕМІЧНОГО ТА
ТРАВМАТИЧНОГО УРАЖЕННЯ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА

Відомо, що надмірна активація NMDA-рецепторів є тригерним фактором у розвитку внутрішньонейрональних метаболічних змін, які асоційовані із енергодефіцитом, оксидативним стресом, дисбалансом в системі нітроген монооксиду. Зазначені процеси являють собою провідний напрямок, у колі якого є сенс впроваджувати заходи, спрямовані на реалізацію засад первинної нейроретинопротекторної терапії. Раніше було показано, що модулятори NMDA-рецепторів викликають дозозалежну деескалацію маркерів нейродеструкції (рівнів NSE та білка S100 в сироватці крові), амортизують апоптичні, нейрогліопроліферативні, мікроциркуляторні розлади за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору. При цьому найбільшу ефективність щодо корекції вказаних процесів в сітківці ока виявляв інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат у дозі 5 мг/кг в/в, а у дозі 2,5 мг/кг в/в цей засіб зіставлявся з інгібітором фенциклідинового сайту мемантином у дозі 20 мг/кг в/шл, відповідно. Завданням цього розділу роботи було дослідження впливу модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни (оксидативний стрес, енергодефіцит, стан системи оксиду азоту) в сітківці за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів. Також було вивчено питання щодо можливого зв'язку метаболічних порушень зі змінами біохімічних та цитометричних маркерів нейродеструкції, апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки з метою обґрунтування нових патогенетичних підходів до нейроретинопротекції за допомогою модуляторів NMDA-рецепторів.

4.1 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів

Результати наших досліджень показали (рис. 4.1), що у інтактних щурів вміст АТФ в сітківці за показником медіани (Me) становив 59,3 (95% ДІ 51,5-67,6) нмоль/мг протеїну. Накладання ретробульбарних лігатур без послідуєчого затягування не викликало суттєвих змін в енергетичному обміні в сітківці ока дослідних щурів, адже рівень АТФ у псевдооперованих тварин зіставлявся із таким у інтактних тварин і становив 58,6 (95% ДІ 53,9-62,8) нмоль/мг протеїну. Моніторинг вмісту АТФ у щурів з моделлю ІР засвідчив, що розвиток нейродеструктивних процесів в зоровому аналізаторі асоціюється з формуванням енергодефіциту. Так, після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури, реєструвалось зниження пулу АТФ в сітківці ока через 24 години – до 23,2 (95% ДІ 20,7-28,3) нмоль/мг протеїну, що було нижчим за показники у інтактних та псевдооперованих тварин в 2,5-2,6 рази (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,01$).

Дослідження вмісту АТФ в сітківці через 7 діб після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури засвідчило збереження постішемічного енергодефіциту в зоровому аналізаторі. Так, рівень АТФ у дослідних щурів з моделлю ІР на 7-му добу становив 32,4 (95% ДІ 27,2-34,9) нмоль/мг протеїну і був нижчим в 1,65 рази, ніж у псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$), але вищим в 1,4 рази, ніж станом через 24 години ($p < 0,05$). Збереження енергодефіциту в сітківці може підтримувати гіперактивацію NMDA-рецепторів (через порушення АТФ-залежного гомеостазу іонів та накопичення глутамату в синаптичній щілині). Цілком очевидно, що ступінь енергодефіциту через 24 години після ішемії/реперфузії тканин ока може впливати на подальший перебіг постреперфізуйного ураження сітківки та зорового нерву. Тому, найбільш важливо забезпечити підтримку пулу АТФ упродовж першої доби ішемічного ураження зорового аналізатору.

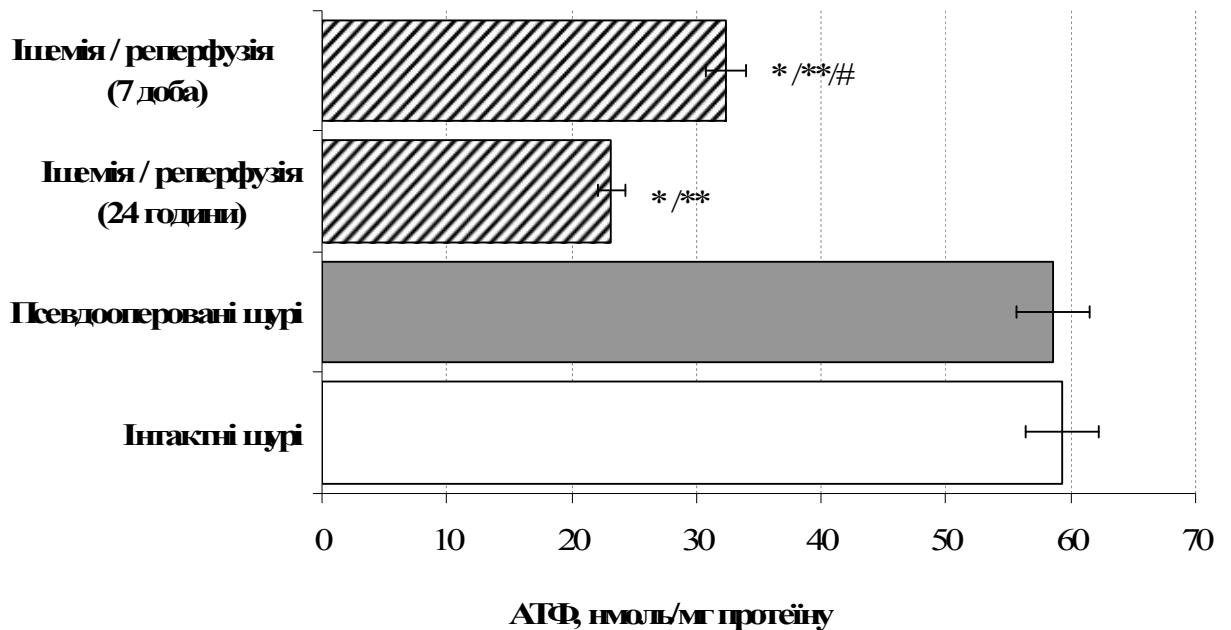


Рис. 4.1. Рівень АТФ в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока (n=7, M±m). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * (p<0,001); псевдооперовані - ** (p<0,001); ішемія/ реперфузія 24 години - # (p<0,05).

Тому на наступному етапі вплив модуляторів активності NMDA-рецепторів вміст АТФ в сітківці оцінювався через 24 години після постреперфузійного ураження зорового аналізатору. Встановлено, що застосування амантадину сульфату та мемантину сприяло збереженню загального пулу АТФ практично з однаковою ефективністю (рис. 4.2). Так, рівень АТФ у щурів в групах IP+амантадин та IP+мемантин достовірно перевершував цей показник у тварин групи IP+0,9% NaCl в середньому відповідно у 1,66 і 1,5 рази. По відношенню до псевдооперованих щурів, пул АТФ у щурів з ішемічно-реперфузійним ураженням зорового аналізатора, лікованих амантадином та мемантином, залишився достовірно нижчим в 1,46 та 1,61 рази, відповідно.

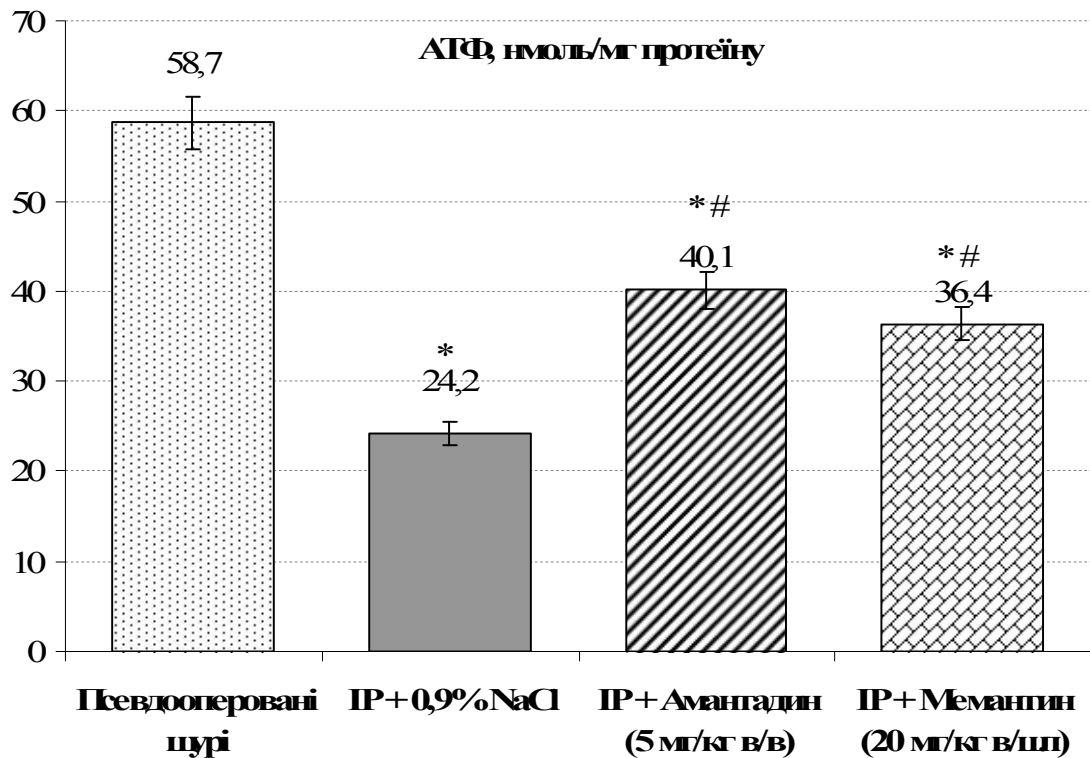


Рис. 4.2. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень АТФ в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока через 24 години (n=7, M±m). Достовірність відмінностей щодо групи псевдооперовані - * (p<0,01); IP + 0,9% NaCl - # (p<0,05).

Ішемічне ушкодження зорового аналізатора характеризувалось активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в сітківці ока упродовж 1-ої доби із помірним регресом на 7-му добу після реперфузії (рис. 4.3). Так, у інтактних щурів рівень малонового диальдегіду (МДА) в сітківці ока становив 4,20 (95% ДІ 3,69-5,05) нмоль/мг протеїну. У псевдооперованих щурів рівень МДА в сітківці суттєво не відрізнявся від такого у інтактних тварин і в середньому становив 4,35 (95% ДІ 3,99-5,25) нмоль/мг протеїну. Дослідження рівня МДА у щурів з моделлю IP засвідчило прогресування оксидативного стресу в сітківці. Адже 60-хвилинне накладання ретробульбарної лігатури зумовило значуще підвищення рівня МДА через 24 години – до 11,2 (95% ДІ 9,32-15,0) нмоль/мг протеїну, що перевищувало

показники у інтактних та псевдооперованих тварин в 2,4 рази (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Оцінка рівня МДА в сітківці через 7 діб після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури засвідчила помірне зниження ознак окисної деструкції мембранних структур в сітківці ока. Так, рівень показника у дослідних щурів з моделлю ІР на 7-му добу становив 7,78 (95% ДІ 6,49-10,2) нмоль/мг протеїну і був вищим в 1,79 рази (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 2,88$, $p = 0,002$), ніж у псевдооперованих щурів, і нижчим в 1,44 рази, ніж у гострому постреперфузійному періоді (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 2,86$, $p = 0,002$). Підвищений рівень МДА в сітківці на тлі енергодефіцитного стану через 7 діб після реперфузії свідчить про персистенцію мітохондріальної дисфункції та ПОЛ.

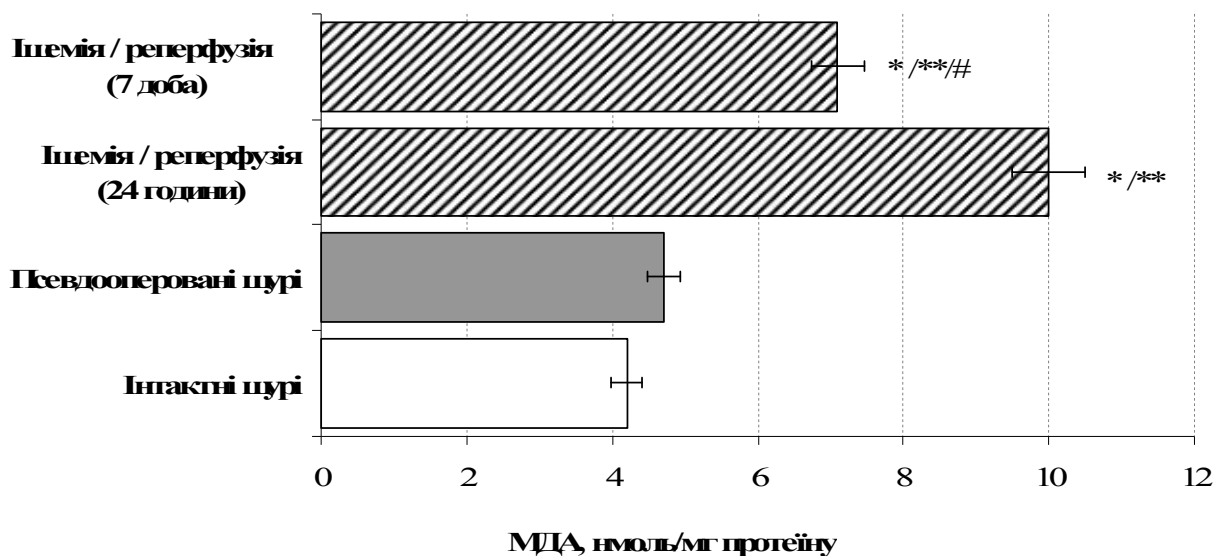


Рис. 4.3. Рівень МДА в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока ($n=7$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/ реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Цілком очевидно, що ефективність нейроретинопротекції може визначатись спроможністю модуляторів NMDA-рецепторів стримувати розвиток оксидативного стресу упродовж перших 24 годин після ішемічного

ураження зорового аналізатору. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів достовірно зменшувало ознаки пероксидної деструкції клітинних мембран і більший ефект спостерігався при введенні блокатору поліамінового сайту, ніж при введенні блокатору фенциклідинового сайту. Зокрема, рівень МДА в сітківці у щурів в групах IP+амантадин та IP+мемантин був достовірно нижчим у 2,14 та 1,81 рази, ніж у тварин групи IP+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.4). По відношенню до псевдоперованих щурів, рівень МДА у щурів з ішемічно-реперфузійним ураженням зорового аналізатора, лікованих амантадином та мемантину, залишився достовірно вищим в 1,20 та 1,42 рази, відповідно. При цьому, рівень МДА в групі IP+мемантин був вищим в 1,18 рази, ніж в групі IP+амантадин.

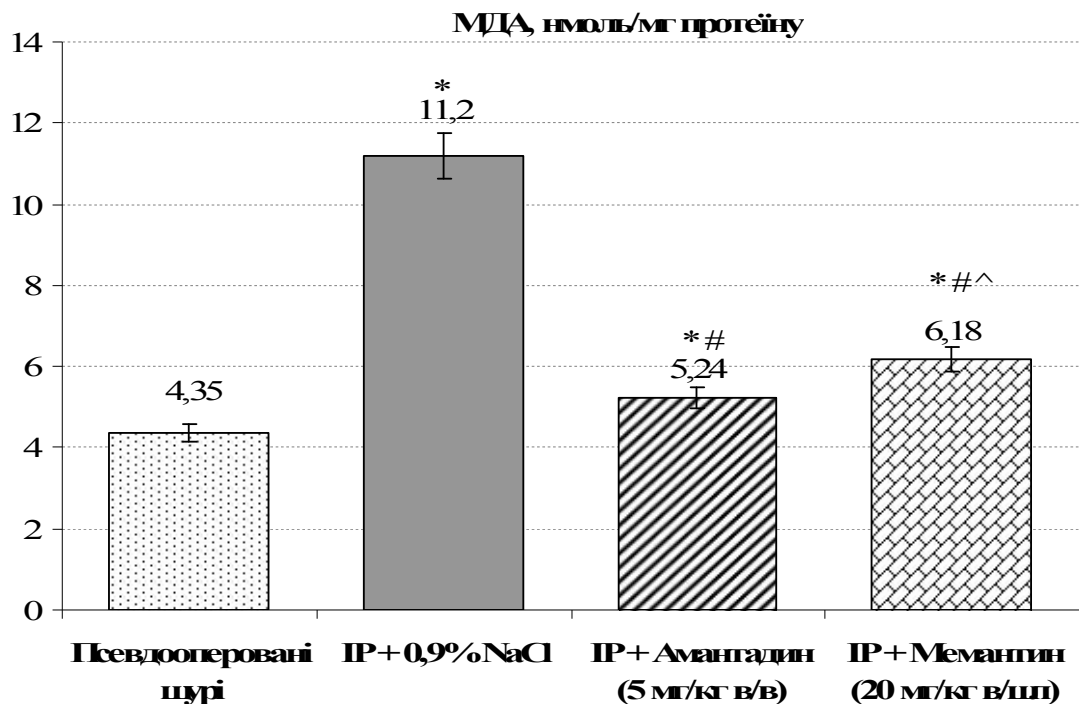


Рис. 4.4. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень МДА в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока (n=7, M±m). Достовірність відмінностей щодо групи псевдоперовані - *(p<0,01); IP + 0,9% NaCl - #(p<0,05); IP + Амантадин - ^ (p<0,05).

За умов ішемії-реперфузії гіперпродукція активних форм кисню спричиняє ушкодження не лише мембранних фосфоліпідів та гліколіпідів, а

й викликає окисну модифікацію структурних й регуляторних білків в клітинних та субклітинних структурах. Накопичення карбонільованих дериватів білків поглиблює порушення протеостазу, знижує вітальність нейрональних клітин та промотує нейроапоптоз [74, 75].

За результатами наших досліджень, після 60-хвилинної ішемії / реперфузії в сітківці ока щурів упродовж 1-ої доби спостерігалось значне зростання рівня карбонільованих протеїнів (КГП) із незначним регресом на 7-му добу після реперфузії (рис. 4.5). У інтактних щурів рівень КГП в сітківці ока становив 1,96 (95% ДІ 1,68-2,28) нмоль/мг протеїну. У псевдооперованих щурів рівень КГП в сітківці суттєво не відрізнявся від такого у інтактних тварин і в середньому становив 2,05 (95% ДІ 1,74-2,28) нмоль/мг протеїну. У щурів з ІР реєструвалось достовірне підвищення рівня КГП через 24 години – до 5,18 (95% ДІ 4,90-5,41) нмоль/мг протеїну, що перевищувало показники у інтактних та псевдооперованих тварин в 2,68 рази (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$).

Через 7 діб після 60-хвилинного накладання ретробульбарної лігатури рівень КГП в сітківці становив 4,92 (95% ДІ 3,95-5,09) нмоль/мг протеїну і був вищим в 2,4 рази (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$), ніж у псевдооперованих щурів, і практично не відрізнявся від такого у гострому постреперфузійному періоді ($p > 0,05$). Підвищений рівень КГП в сітківці через 7 діб після реперфузії може бути одним із чинників, що підтримують проапоптичну трансформацію та загибель ретинальних клітин у ішемічно-ушкодженому зоровому аналізаторі. Цілком очевидно, що важливим критерієм нейроретинопротекторного ефекту модуляторів NMDA-рецепторів може бути вплив на процеси карбонілювання протеїнів сітківки, особливо на початкових етапах (упродовж перших 24 годин) ішемічного ураження зорового аналізатору.

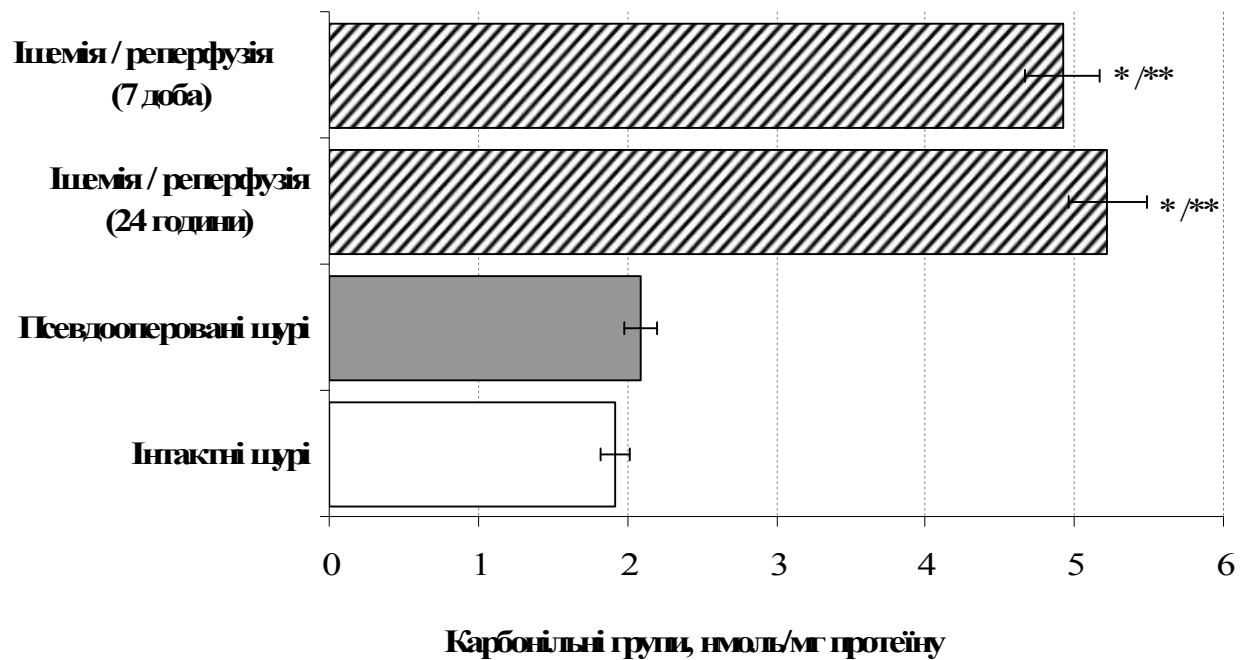


Рис. 4.5. Рівень карбонільних груп протеїнів в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока ($n=7$, $M\pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p<0,001$); псевдооперовані - ** ($p<0,001$).

Введення фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів достовірно пригнічувало процеси окисної модифікації протеїнів в сітківці ока щурів з ішемічним ураженням зорового аналізатора. Як і у випадку з рівнем МДА, більший блокувальний ефект на процеси карбонілювання протеїнів спостерігався при введенні блокатору поліамінового сайту, ніж при введенні блокатору фенциклідинового сайту. Наприклад, рівень КГП в сітківці у щурів в групах IP+амантадин та IP+мемантин був достовірно нижчим у 2,0 та 1,67 рази, ніж у тварин групи IP+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.6).

По відношенню до псевдооперованих щурів, рівень КГП у щурів з ішемічно-реперфузійним ураженням зорового аналізатора, лікованих амантадином (5 мг/кг в/в) та мемантином (20 мг/кг в/шл), залишився достовірно вищим в 1,27 та 1,51 рази, відповідно. При цьому, рівень КГП в групі IP+мемантин був вірогідно вищим в 1,2 рази, ніж в групі IP+амантадин.

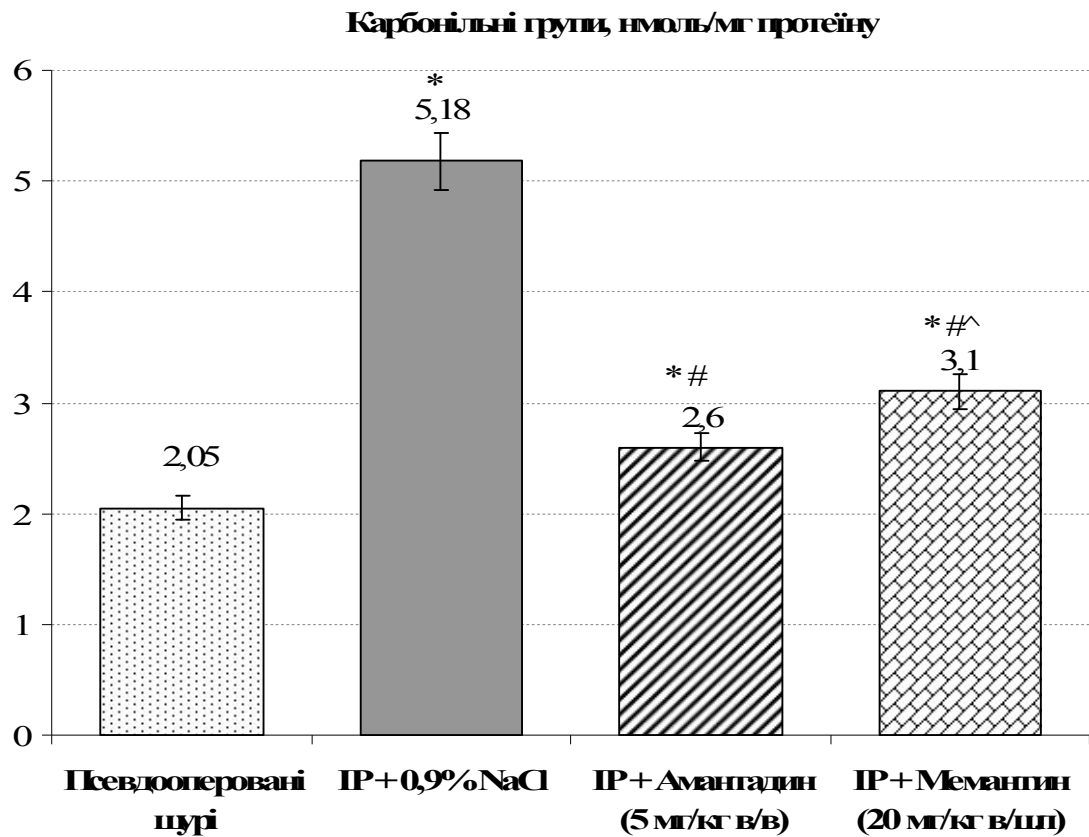


Рис. 4.6. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень карбонільних груп протеїнів в сітківці щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=7$, $M\pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи псевдооперовані - * ($p<0,01$); IP + 0,9% NaCl - # ($p<0,05$); IP + амантадин - ^ ($p<0,05$).

За умов ішемії/реперфузії ока розвиток оксидативного стресу відбувається особливо інтенсивно, оскільки лише у сітківці ока глутамат-індукована ексайтотоксичність поєднується з прямою фотооксидацією ліпідів у фоторецепторних елементах. Особливу роль у контролі активності ПОЛ в ретинальних фоторецепторах та ретинальному пігментному епітелії відіграє антиоксидантний ензим глутатіонпероксидаза, що здатний відновлювати комплекси ліпідних гідропероксидів, інкорпорованих в біомембрани та ліпопротеїни зорового аналізатора [179, 201]. За сучасними уявленнями, глутатіонпероксидаза (зокрема, ізоензим GPx4) є одним із ключових чинників, який детермінує вітальність фоторецепторних клітин сітківки та

запобігає нейроапоптозу [179, 201]. Результати наших досліджень засвідчили (рис. 4.7), що у псевдооперованих та інтактних щурів питома активність глутатіонпероксидази в сітківці була співставною і складала 7,46 (95% ДІ 6,19-8,52) мкмоль/хв·мг протеїну, відповідно. В той же час, через 24 години після реперфузії ока активність глутатіонпероксидази становила 3,1 (95% ДІ 2,45-3,8) мкмоль/хв·мг протеїну, що було нижчим в 2,41 рази, ніж у псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Через 7 діб після реперфузії активність глутатіонпероксидази в сітківці залишалась суттєво зниженою (в 1,78 рази відносно псевдооперованих щурів) і становила 4,1 (95% ДІ 3,35-4,7) мкмоль/хв·мг протеїну (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 2,86$, $p = 0,002$). Зауважимо, що станом на 7 добу у щурів з ІР ока спостерігалось вірогідне, хоча і слабе підвищення активності вказаного ензиму в сітківці ока (в 1,32 рази) відносно стану через 24 години після реперфузії (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$).

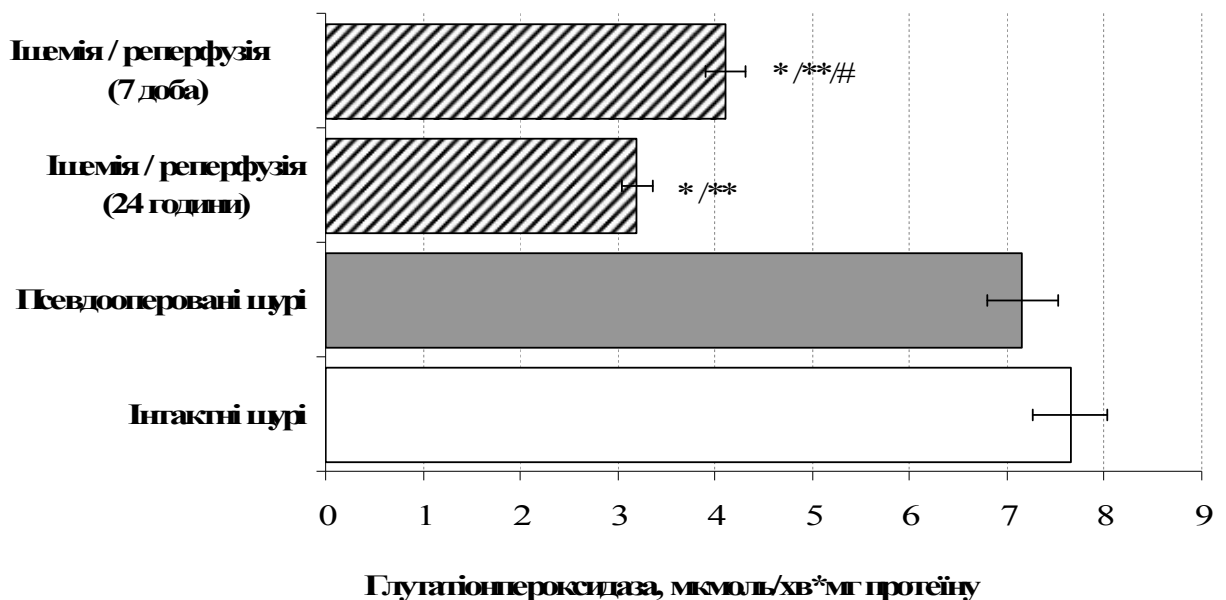


Рис. 4.7. Активність глутатіонпероксидази в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока ($n=7$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/ реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Застосування модуляторів NMDA-рецепторів запобігало зниженню антиоксидантної активності сітківки щурів з ішемічним ураженням зорового аналізатора. За даних умов більший амортизуючий ефект спостерігався при введенні блокатору поліамінового сайту, ніж блокатору фенциклідинового сайту. Так, активність глутатіонпероксидази в сітківці у щурів в групах IP+амантадин та IP+мемантин була достовірно вищою у 1,74 та 1,42 рази, ніж у тварин групи IP+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.8). По відношенню до псевдоперованих щурів, активність глутатіонпероксидази у щурів з IP, лікованих амантадином та мемантином, залишилась достовірно нижчою в 1,37 та 1,64 рази, відповідно. Зауважимо, що активність глутатіонпероксидази в групі IP+амантадин вірогідно перевищувала в 1,21 рази таку в групі IP+мемантин.

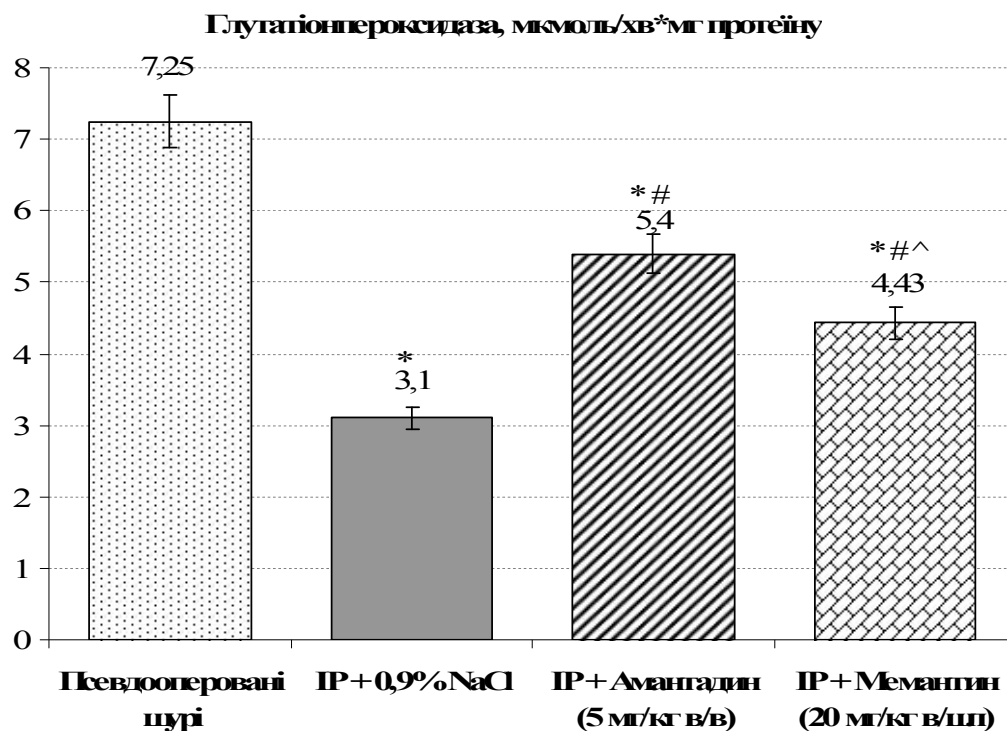


Рис. 4.8. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на активність глутатіонпероксидази в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока (n=7, M±m). Достовірність відмінностей щодо групи псевдоперовані - * (p<0,01); IP + 0,9% NaCl - # (p<0,05); IP + амантадин - ^ (p<0,05).

Поряд з оксидативним стресом за умов ішемії / реперфузії сітківки та зорового нерву завжди виникає нітрозативний стрес як наслідок гіперпродукції нітроген монооксиду (NO) за участі індукційної NO-синтази гліальними клітинами [69, 124]. Взаємодія NO з реакційно-здатними кисневими дериватами викликає утворення реакційно активного пероксинітриту, який володіє потужними мембранотоксичними властивостями, викликаючи модифікацію структурних та регуляторних білків, нуклеїнових кислот, ліпідів. Модуляція продукції NO регулює розвиток апоптозу в сітківці ока [133]. Тому на наступному етапі ми оцінили зміни сумарного вмісту нітратів та нітритів, що є метаболітами NO, в сітківці у різні терміни ішемічно-реперфузійного пошкодження зорового аналізатора.

Встановлено, що базальний рівень нітратів та нітритів у інтактних та псевдооперованих щурів суттєво не відрізнявся і становив 6,04 (95% ДІ 4,64-7,04) нмоль/мг протеїну та 6,24 (95% ДІ 5,18-7,23) нмоль/мг протеїну, відповідно (рис. 4.9). У гострому періоді (через 24 години після реперфузії) вміст нітратів та нітритів підвищився в 3,35 рази відносно псевдооперованих щурів і склав 20,9 (95% ДІ 18,5-23,9) нмоль/мг протеїну (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,2$, $p < 0,001$). Через 7 діб після реперфузії вміст нітратів та нітритів в сітківці залишився суттєво підвищеним (в 2,21 рази відносно псевдооперованих щурів) і становив 13,8 (95% ДІ 12,7-16,5) нмоль/мг протеїну (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Слід відзначити, що рівень нітрозативного стресу в сітківці ока станом на 7 добу був достовірно нижчим, ніж через 24 години після ішемії / реперфузії, про що свідчить вірогідно нижчий (в 1,49 рази) вміст нітратів та нітритів відносно стану через 24 години після реперфузії (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$). Персистенція надлишкової продукції NO в сітківці ока є ще однією детермінантою, яка буде суттєвим чином визначати нейроретинопротекторну ефективність фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів.

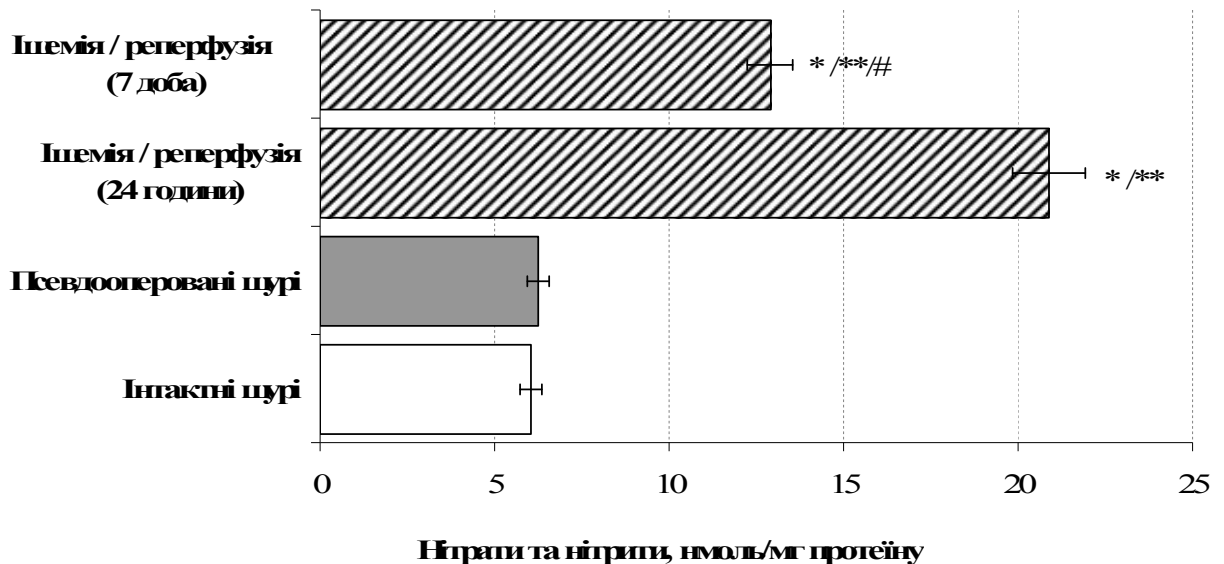


Рис. 4.9. Вміст нітратів та нітритів в сітківці щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=7$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Застосування модуляторів NMDA-рецепторів достовірно зменшувало ознаки нітрозативного стресу в сітківці ока щурів з ішемічним ураженням зорового аналізатора, при цьому, ефективність блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів суттєво не відрізнялась. Наприклад, сумарний вміст нітратів та нітритів в сітківці у щурів в групі IP+амантадин був достовірно нижчим в 1,83 рази, а щурів в групі IP+мемантин - нижчим у 1,64 рази, ніж у тварин групи IP+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.10).

По відношенню до псевдооперованих щурів, рівень нітратів та нітритів у щурів з ішемічно-реперфузійним ураженням зорового аналізатора, лікованих амантадином (5 мг/кг в/в) та мемантином (20 мг/кг в/шл), залишився достовірно вищим в 1,84 та 2,06 рази, відповідно. Рівень нітратів та нітритів в сітківці щурів в групі IP+мемантин вірогідно не відрізнявся від такого в групі IP+амантадин.

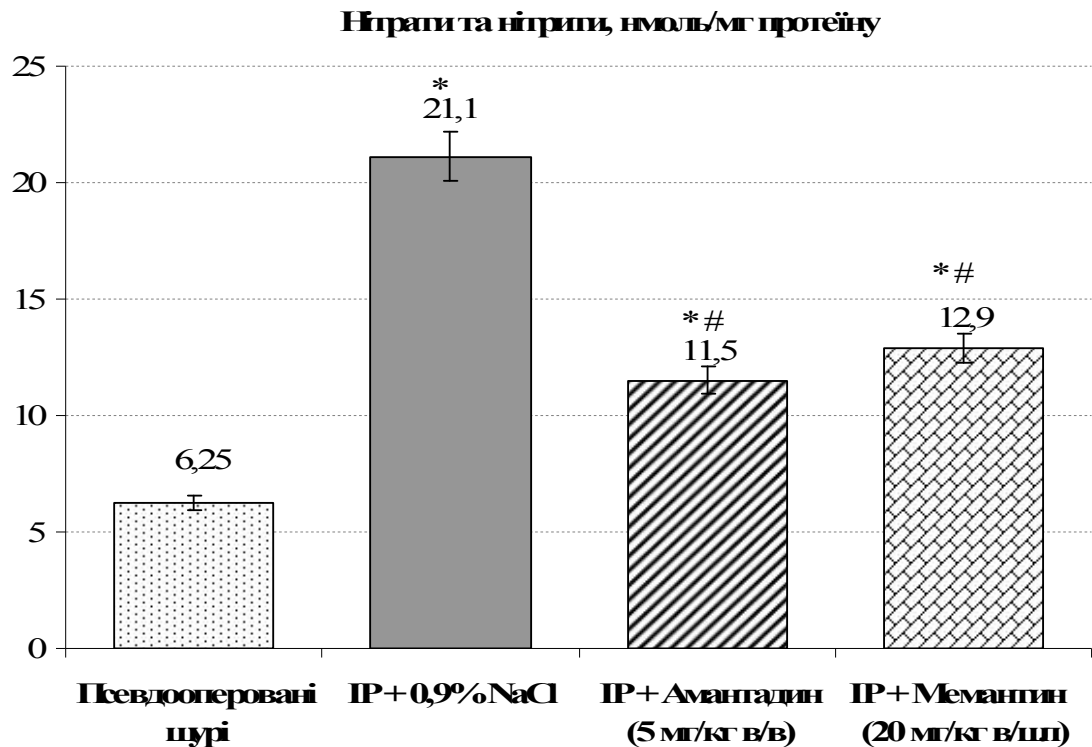


Рис. 4.10. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нітратів та нітритів в сітківці щурів з моделлю ішемії/ реперфузії ока (n=7, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи псевдооперовані - * ($p < 0,01$); IP + 0,9% NaCl - # ($p < 0,05$).

Патобіохімічною основою загибелі нейрональних клітин, в тому числі і в сітківці ока, вважають феномен глутаматної ексайтотоксичності. Глутамат є первинним ретинальним нейротрансмітером, екстрацелюлярна акумуляція якого спричиняє гіперактивацію іонотропних глутаматних рецепторів (AMPA та NMDA) із наступним неконтрольованим надходженням Ca^{2+} у постсинаптичні нейрони та ініціацією апоптичної загибелі клітин [160]. За результатами наших досліджень, рівень глутамату в сітківці ока інтактних та псевдооперованих щурів становив 7,26 (95% ДІ 5,71-8,65) нмоль/мг протеїну та 7,68 (95% ДІ 6,37-8,89) нмоль/мг протеїну, відповідно (рис. 4.11). У гострому періоді (через 24 години після реперфузії) вміст глутамату в сітківці ока підвищився в 2,04 рази відносно псевдооперованих щурів і склав

15,6 (95% ДІ 12,1-18,4) нмоль/мг протеїну (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Через 7 діб після реперфузії вміст глутамату в сітківці залишився суттєво підвищеним (в 1,64 рази відносно псевдооперованих щурів) і становив 12,6 (95% ДІ 10,1-15,3) нмоль/мг протеїну (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U = 2,82$, $p = 0,002$). За цих умов, рівень глутамату в сітківці ока станом на 7 добу був достовірно нижчим (в 1,23 рази), ніж через 24 години після ішемії / реперфузії (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$). Підвищений рівень глутамату може підтримувати перезбудження NMDA-рецепторів нейронів сітківки та промотувати патобіохімічні процеси, асоційовані з глутаматною ексайтотоксичністю.

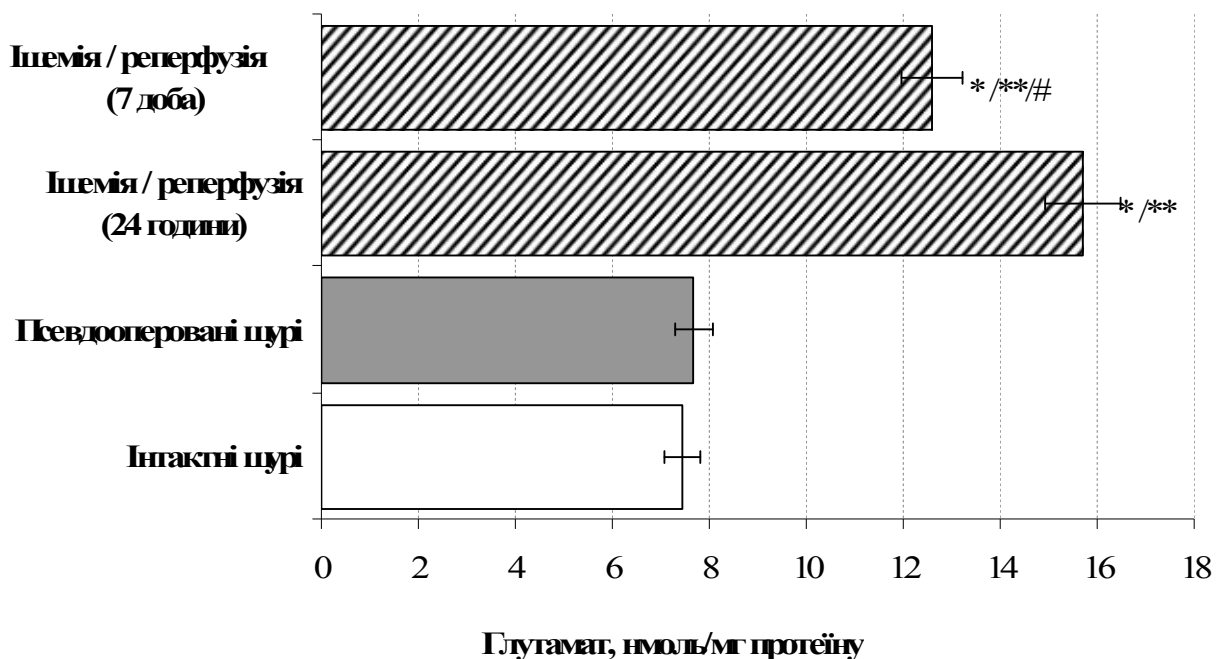


Рис. 4.11. Рівень глутамату в сітківці щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=7$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи інтактні - * ($p < 0,001$); псевдооперовані - ** ($p < 0,001$); ішемія/реперфузія 24 години - # ($p < 0,05$).

Застосування блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів NMDA-рецепторів ефективно перешкоджало наростанню рівня глутамату в сітківці ока у гострому постреперфузійному періоді, без суттєвих міжгрупових відмінностей. Так, рівень глутамату в сітківці у щурів в групі IP+амантадин був достовірно нижчим в 1,61 рази, а щурів в групі IP+мемантин - нижчим у 1,53 рази, ніж у тварин групи IP+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.12). Отже, за антиексайтотоксичним ефектом при ішемії/реперфузії ока амантадину сульфат в дозі 5 мг/кг в/в та мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл виявились співставними.

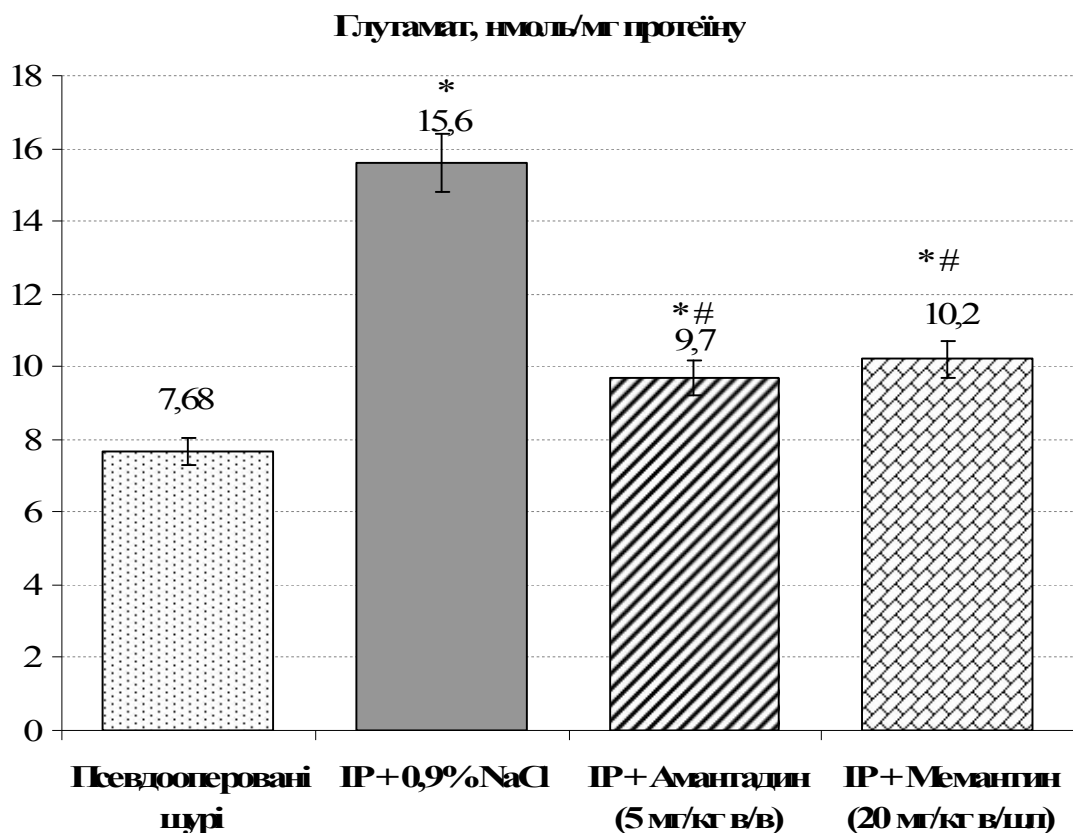


Рис. 4.12. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень глутамату в сітківці щурів з моделлю ішемії/реперфузії ока ($n=7$, $M\pm m$). Достовірність відмінностей щодо групи псевдооперовані - * ($p<0,01$); IP + 0,9% NaCl - # ($p<0,05$).

Таким чином, ішемічно-реперфузійне ушкодження сітківки ока характеризується найбільш виразними ознаками енергодефіциту,

оксидативного та нітрозативного стресу, глутаматної ексайтотоксичності у гострому періоді, і через 7 діб після відновлення кровообігу несприятливий патобіохімічний паттерн зберігається, хоча виразність окремих його складових дещо зменшується. Адамантану сульфат перевершує мемантин за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати активність процесів пероксидації ліпідів та білків, відновлювати антиоксиданту активність за рахунок глутатіонпероксидази. Адамантан зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівень нітратів та нітритів та зменшувати рівень глутамату в ішемізованій сітківці ока у щурів у гострому періоді.

4.2 Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за травматичного ураження зорового аналізатора у кролів

Травматичне ушкодження зорового аналізатора у кролів характеризувалось формуванням значного енергодефіциту в гострому посттравматичному періоді. Результати наших досліджень засвідчили (рис. 4.13), що через 24 години після модельної контузії ока, у дослідних кролів рівень АТФ в сітківці був достовірно нижчим в 2,1 рази, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$; критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3$). У гострий постконтузійний період таке падіння рівня АТФ є наслідком первинної альтерації клітинних та субклітинних елементів сітківки. Станом на 7-му добу постконтузійного ураження ока спостерігалось достовірне поглиблення енергодефіциту із зниженням рівня АТФ в 3,0 рази відносно інтактних тварин ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$) та в 1,4 рази відносно стану на 1-шу добу після контузії ока ($p < 0,05$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,0$). Такі зміни можуть вказувати на поглиблення мітохондріальної дисфункції на тлі вторинної альтерації та прогресування некробіозу та апоптозу клітинних елементів сітківки та зорового нерва за контузійного ураження ока, і узгоджуються зі змінами біохімічних та цитометричних маркерів нейродеструкції та апоптозу. Зауважимо, що за

ішемічного ушкодження зорового аналізатора після відновлення кровообігу виразність енергодефіциту станом на 7-му добу навпаки зменшувалась. Отже, за умов контузії ока ретинопротекторний потенціал модуляторів NMDA-рецепторів повинен найбільш повно реалізуватись у гострому періоді, щоб амортизувати вторинні нейродеструктивні процеси.

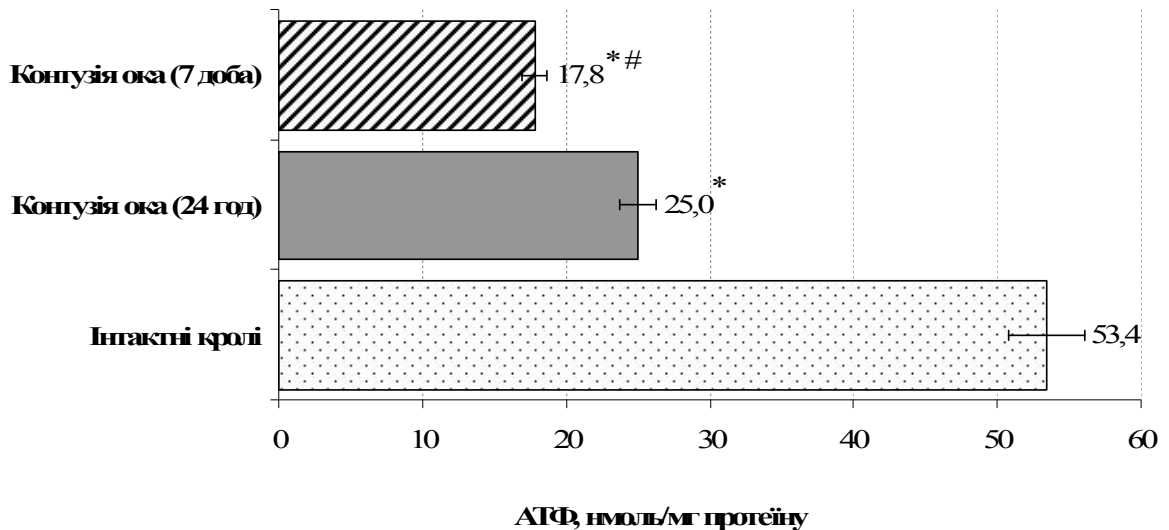


Рис. 4.13. Рівень АТФ в сітківці кролів з модельною контузією ока (n=6, M±m). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * (p<0,001); відносно групи контузія ока 24 години - # (p<0,05).

Тому на наступному етапі вплив модуляторів активності NMDA-рецепторів на вміст АТФ в сітківці оцінювався через 24 години після постконтузійного ураження зорового аналізатору. Встановлено, що застосування блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів NMDA-рецепторів сприяло збереженню загального пулу АТФ в сітківці за умов контузійної травми із вірогідними відмінностями щодо виразності ефекту (рис. 4.14). Так, за умов застосування амантадину сульфату (5 мг/кг в/в) рівень АТФ в сітківці кролів через 1 добу після контузії ока достовірно перевершував цей показник у тварин групи контузія+0,9% NaCl в середньому у 1,58 рази. За умов застосування мемантину (20 мг/кг в/шл) рівень АТФ в сітківці виявився вищим в 1,34 рази, ніж в групі контрольної патології. Пул

АТФ в сітківці у кролів, лікованих амантадином, достовірно перевищував в 1,17 рази показник у тварин, лікованих мемантином.

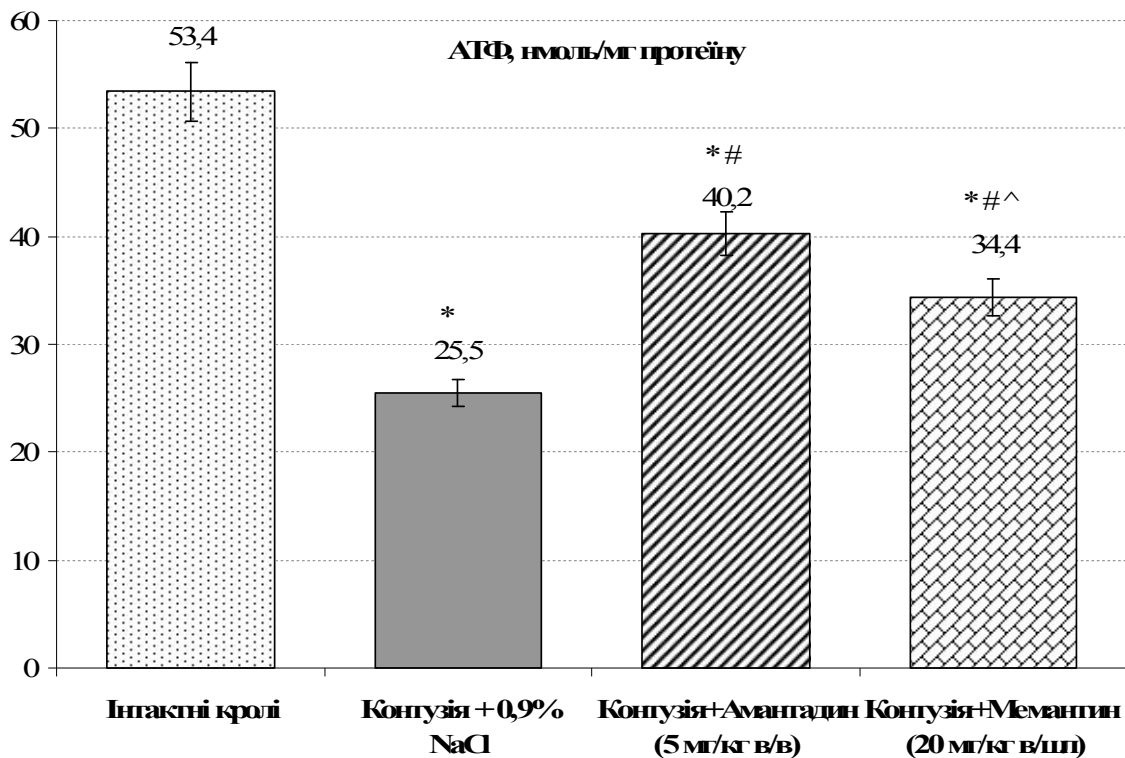


Рис. 4.14. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень АТФ в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p < 0,05$); контузія + амантадин - ^ ($p < 0,05$).

За умов контузійної травми ока в сітківці відбувалось значне посилення процесів ліпопероксидації (рис. 4.15). Про це свідчить достовірно вищий рівень МДА (в 2,37 рази) в сітківці кролів вже через 24 години після контузійної травми зорового аналізатора порівняно з інтактними тваринами ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$). Станом на 7-му добу спостерігалось наростання ознак оксидативного стресу, адже рівень МДА у дослідних кролів був достовірно вищим в 2,89 рази, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$). Слід відзначити, що за травматичного ушкодження зорового аналізатора рівень МДА в сітківці станом на 7-му добу був достовірно вищим в 1,22 рази, ніж

станом на 1-шу добу ($p < 0,05$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,0$). Тобто, за умов контузії інтенсивність окисної деструкції мембранних структур в сітківці прогресивно наростала, в той час як за умов ішемічного ушкодження сітківки через 7 днів після відновлення кровопостачання спостерігався певний регрес активності ПОЛ. Цілком очевидно, що збереження цілісності клітинних та субклітинних мембран фоторецепторів на початкових етапах травматичного ушкодження зорового аналізатора є одним із важливих критеріїв ефективності потенційних ретинопротекторів.

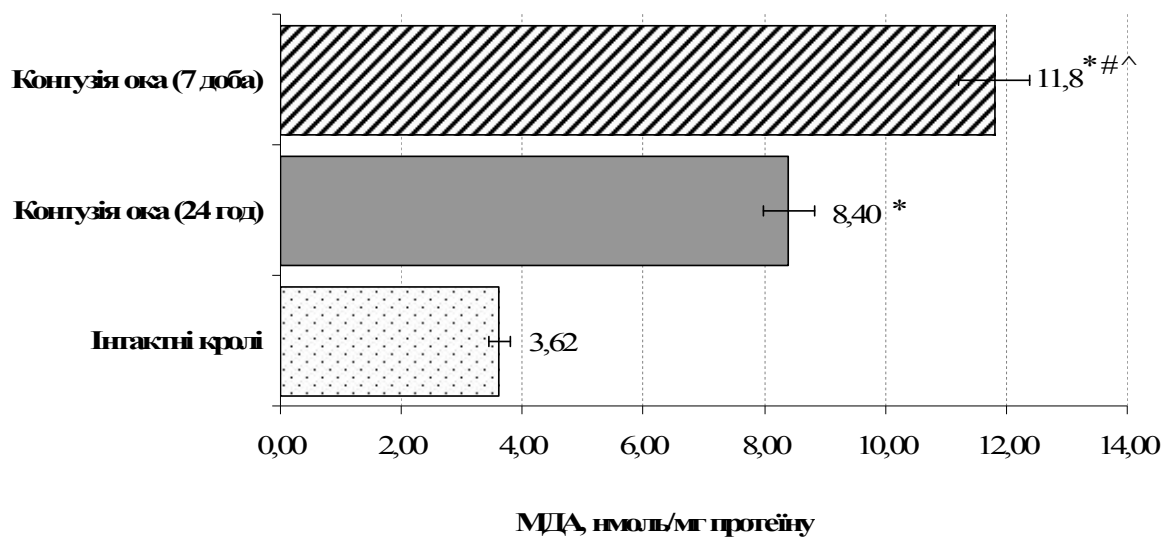


Рис. 4.15. Рівень МДА в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години - # ($p < 0,05$).

Виявилось, що застосування блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів NMDA-рецепторів ефективно стримувало розвиток оксидативного стресу та перешкоджало деструкції мембранних ліпідів в сітківці за умов контузійного пошкодження зорового аналізатора (рис. 4.16). Так, за умов застосування амантадину сульфату (5 мг/кг в/в) рівень МДА в сітківці кролів через 1 добу після контузії ока був достовірно нижчим у 1,83 рази, ніж у тварин групи контузія+0,9% NaCl. За умов застосування мемантину (20 мг/кг в/шл) рівень МДА в сітківці виявився нижчим в 1,44

рази, ніж в групі контрольної патології. В цілому, вміст МДА в сітківці у кролів, лікованих амантадином, був достовірно нижчим в 1,27 рази, ніж у тварин, лікованих мемантином.

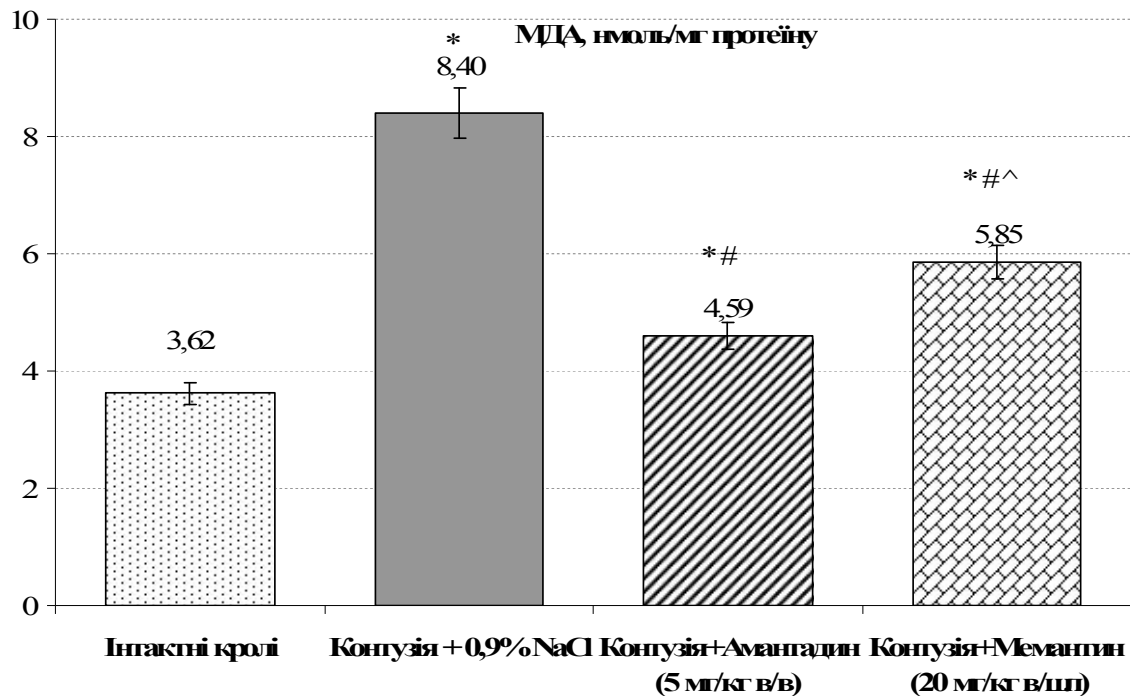


Рис. 4.16. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень МДА в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p < 0,05$); контузія + амантадин - ^ ($p < 0,05$).

Ще одним відображенням розвитку оксидативного стресу за умов контузійної травми ока було накопичення карбонільованих протеїнів в сітківці (рис. 4.17). Вже через 24 години після контузії реєструвалось достовірне зростання рівня КГП (в 3,81 рази) в сітківці кролів порівняно з інтактними тваринами ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$). Станом на 7-му добу спостерігалось наростання ознак оксидативного пошкодження протеїнів, а саме рівень КГП у дослідних кролів був достовірно вищим в 5,21 рази, ніж у інтактних тварин ($p < 0,001$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,2$). Зауважимо, що за травматичного

ушкодження зорового аналізатора рівень КГП в сітківці станом на 7-му добу був достовірно вищим в 1,37 рази, ніж станом на 1-шу добу ($p < 0,05$, критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,0$). Тобто, за умов контузії інтенсивність окисної модифікації протеїнів в сітківці прогресивно наростала, на відміну від ішемічного ушкодження сітківки, при якому через 7 діб спостерігалось зниження інтенсивності процесів карбонілування протеїнів. Надмірна акумуляція окисно-модифікованих протеїнів у клітинних елементах сітківки може бути чинником вторинної альтерації, що потенціює процеси апоптозу та некробіозу за травматичного ушкодження зорового аналізатора. Тому здатність амортизувати порушення протеостазу в сітківці на ранніх етапах контузії ока є вагомим критерієм ефективності потенційних нейроретинопротекторів.

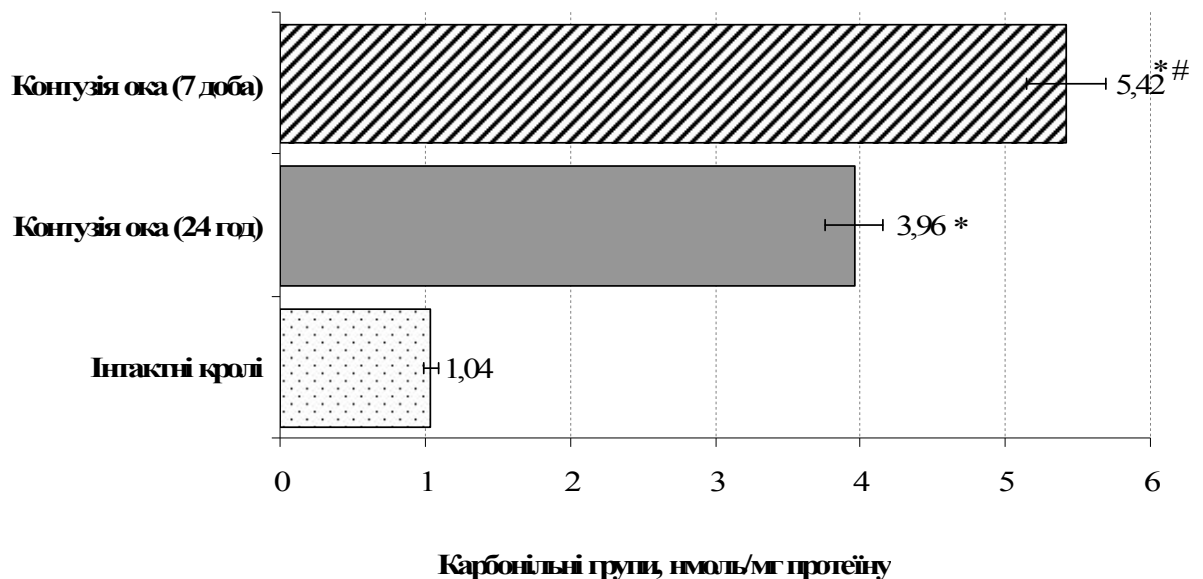


Рис. 4.17. Рівень карбонільних груп протеїнів в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години - # ($p < 0,05$).

Введення фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів достовірно пригнічувало процеси окисної модифікації протеїнів в сітківці ока кролів з

травматичним ураженням зорового аналізатора. Більш значуще пригнічення процесів карбонілювання протеїнів спостерігалось при введенні блокатору поліамінового сайту, ніж при введенні блокатору фенциклідинового сайту. Так, станом на 1-шу добу рівень КГП в сітківці у щурів в групах контузія+амантадин та контузія+мемантин був достовірно нижчим у 2,96 та 1,97 рази, ніж у тварин в групі контузія+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.18). Рівень КГП в сітківці у кролів з травматичним ураженням зорового аналізатора, лікованих амантадином та мемантином, залишився достовірно вищим в 1,21 та 1,81 рази, ніж у інтактних кролів, відповідно. При цьому, рівень КГП в групі контузія+мемантин був вірогідно вищим в 1,5 рази, ніж в групі контузія+амантадин.

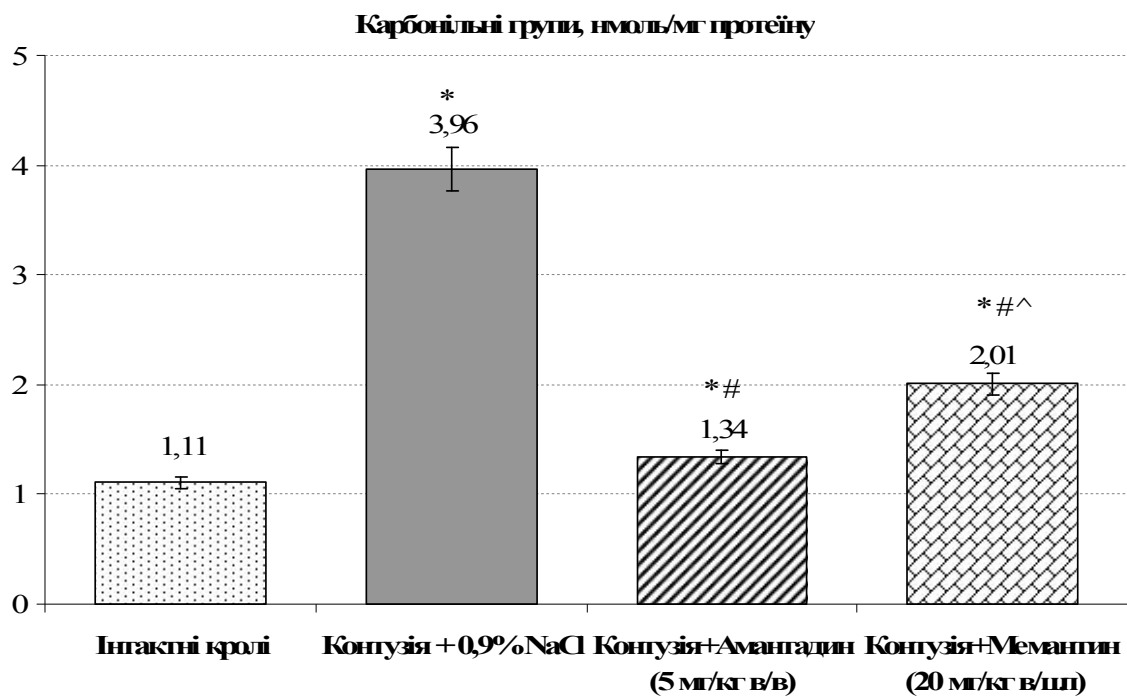


Рис. 4.18. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень карбонільних груп в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p < 0,05$); контузія + амантадин - ^ ($p < 0,05$).

Травматичне ушкодження зорового аналізатора супроводжувалось прогресуючим зниженням активності антиоксидантного ензиму

глутатіонпероксидази, що детермінує вітальність світлочутливих сенсорних нейронів сітківки (рис. 4.19). Так, станом на 1-шу добу після контузії ока активність глутатіонпероксидази в сітківці кролів була достовірно нижчою в 1,88 рази, ніж у інтактних кролів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Через 7 діб після травми активність глутатіонпероксидази в сітківці знижувалась ще більш суттєво - в 2,47 рази відносно інтактних кролів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,8$, $p < 0,01$) та в 1,31 рази відносно стану на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$).

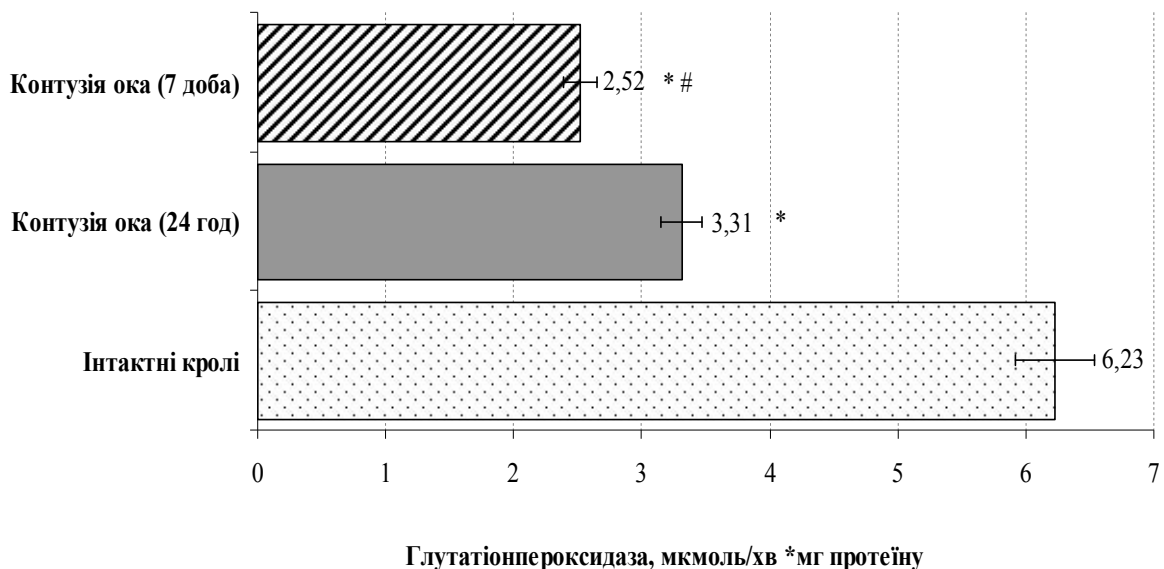


Рис. 4.19. Активність глутатіонпероксидази в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години - # ($p < 0,05$).

Введення інгібіторів NMDA-рецепторів амортизувало зниження антиоксидантної активності сітківки кролів з травматичним ураженням зорового аналізатора. Більш значущий протекторний ефект спостерігався при введенні блокатору поліамінового сайту, ніж блокатору фенциклідинового сайту. Так, активність глутатіонпероксидази в сітківці у кролів в групах

контузія+амантадин та контузія+мемантин була достовірно вищою у 1,48 та 1,21 рази, ніж у тварин групи контузія+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.20). По відношенню до інтактних кролів, активність глутатіонпероксидази у кролів з контузією ока, лікованих амантадином та мемантином, залишилась достовірно нижчою в 1,27 та 1,54 рази, відповідно. Крім того, активність глутатіонпероксидази в групі контузія+амантадин вірогідно перевищувала в 1,22 рази таку в групі контузія+мемантин.

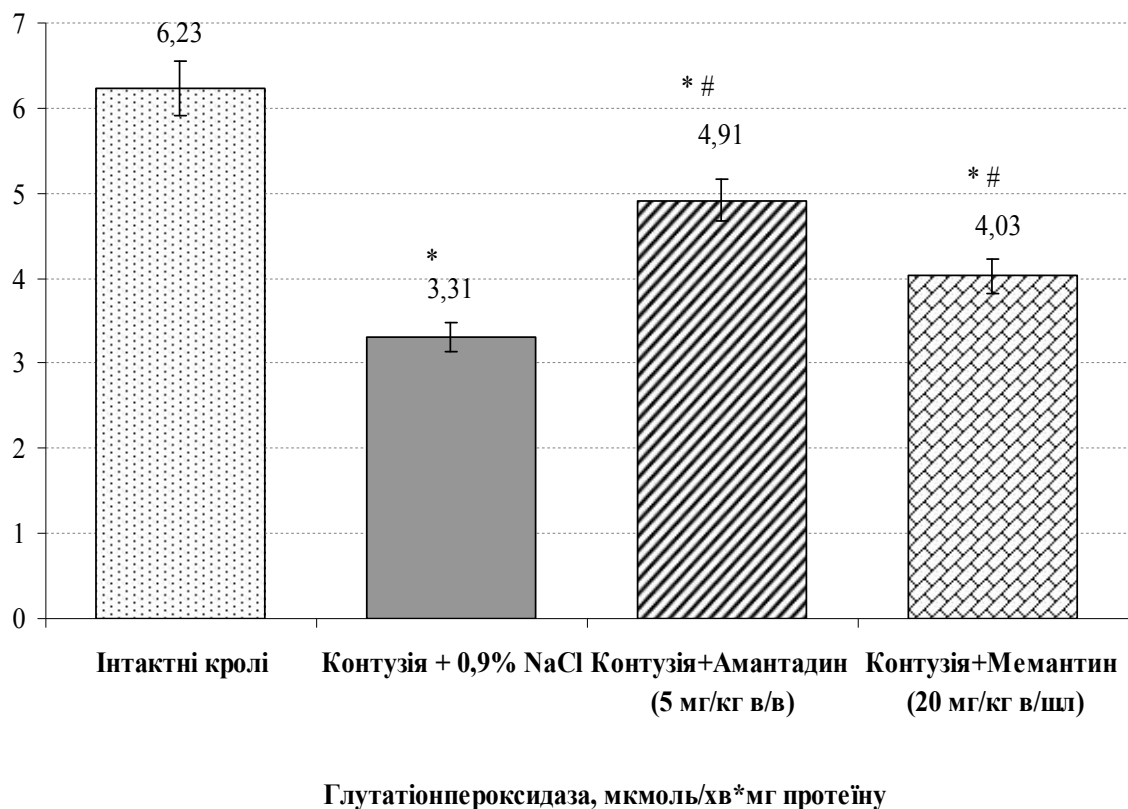


Рис. 4.20. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на активність глутатіонпероксидази в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M\pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p<0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p<0,05$); контузія + амантадин - ^ ($p<0,05$).

Травматичне ушкодження зорового аналізатору асоціювалось із інтенсивним розвитком нітрозативного стресу (рис. 4.21). Про це свідчить значуще підвищення в сітківці ока рівня метаболітів NO - нітратів та нітритів порівняно із таким у інтактних кролів - в 3,23 рази станом на 1-шу

добу та в 3,86 рази станом на 7-му добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,2$, $p < 0,001$). Крім того, через 7 діб після контузії очна вміст нітратів та нітритів в сітківці був достовірно вищим в 1,20 рази, ніж через 24 години після травми (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,0$, $p < 0,05$). Таким чином, на відміну від моделі ішемії/реперфузії ока, модель травматичного ушкодження зорового аналізатора характеризувалась не лише персистенцією, а й значним поглибленням ознак нітрозативного стресу.

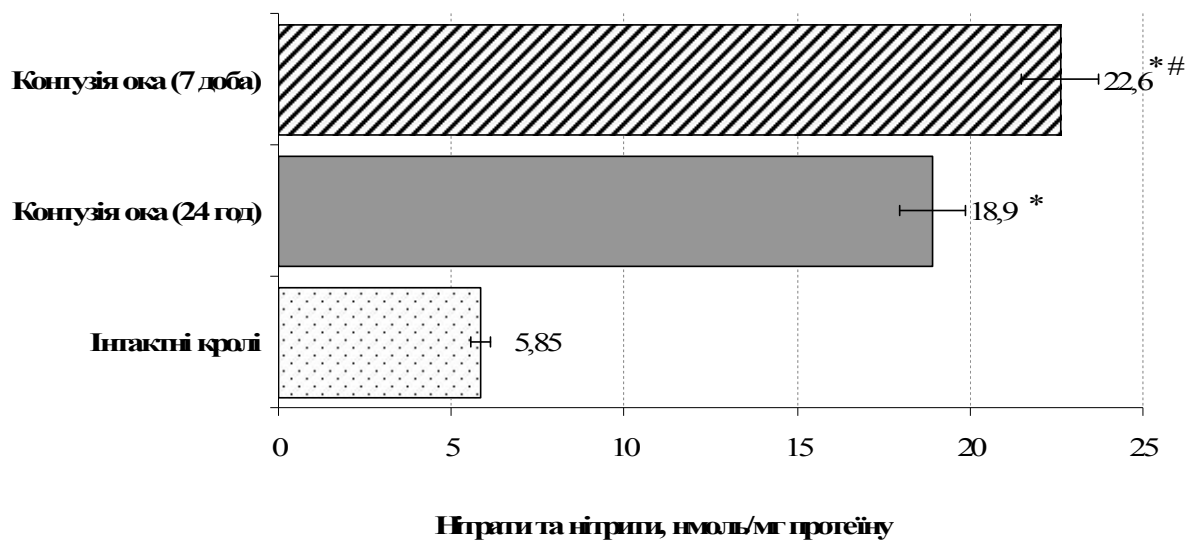


Рис. 4.21. Рівень нітритів та нітратів в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години -# ($p < 0,05$).

Введення модуляторів NMDA-рецепторів достовірно зменшувало ознаки нітрозативного стресу в сітківці ока тварин з травматичним ураженням зорового аналізатора, без суттєвих відмінностей щодо ефективності блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів (рис. 4.22). Так, сумарний вміст нітратів та нітритів в сітківці у кролів в групі контузія+амантадин був достовірно нижчим в 1,82 рази, а у кролів в групі контузія+мемантин - нижчим у 1,67 рази, ніж у тварин групи контузія+0,9% NaCl, відповідно. По відношенню до інтактних кролів, рівень нітратів та нітритів у кролів з травматичним ураженням зорового аналізатора, лікованих

амантадином (5 мг/кг в/в) та мемантином (20 мг/кг в/шл), залишився достовірно вищим в 1,78 та 1,93 рази, відповідно.



Рис. 4.22. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нітратів та нітритів в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p < 0,05$).

Травматичне ушкодження зорового аналізатора асоціюється із значною первинною альтерацією клітинних та субклітинних структур, що зумовлює зростання рівня екстрацелюлярного рівня глутамату із розвитком глутаматної ексайтотоксичності. Результати наших досліджень засвідчили (рис. 4.23), що у гострому періоді (через 24 години після контузії) вміст глутамату в сітківці ока тварин підвищився в 2,02 рази відносно інтактних кролів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Через 7 діб після контузії ока спостерігалось ще більш значуще зростання вмісту глутамату в сітківці - в 2,42 рази відносно інтактних тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 3,0$, $p < 0,001$). Станом на 7 добу після контузії ока

рівень глутамату в сітківці ока був достовірно вищим (в 1,2 рази), ніж через 24 години після травми (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U > 2,1$, $p < 0,05$). Зауважимо, що за ішемічного ушкодження зорового аналізатора на 7-му добу спостерігалась слабка деескалація рівня глутамату в сітківці.

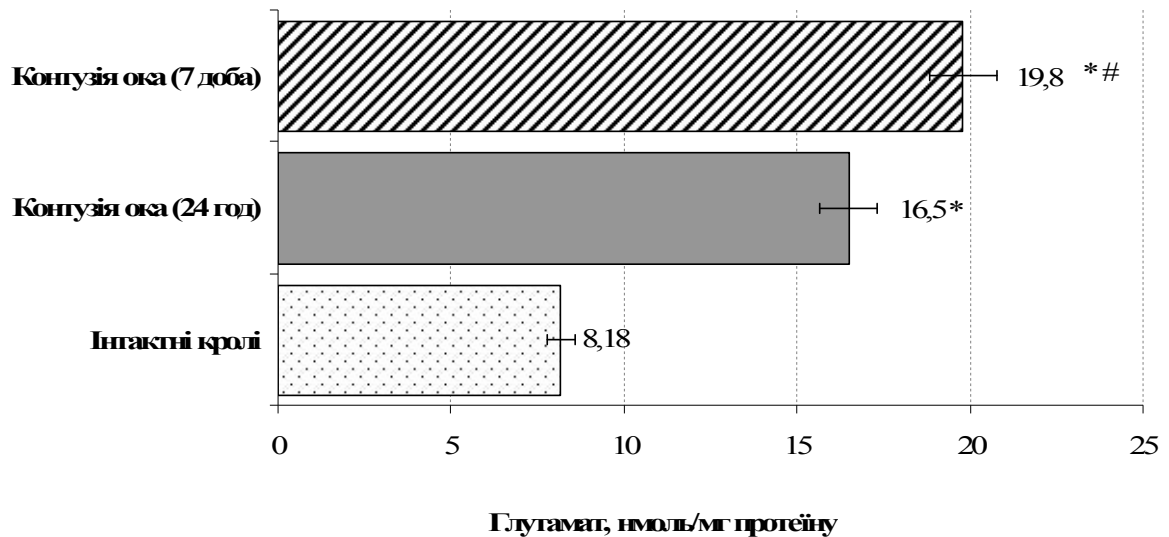


Рис. 4.23. Рівень глутамату в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M \pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p < 0,001$); відносно групи контузія ока 24 години - # ($p < 0,05$).

Застосування блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайтів NMDA-рецепторів ефективно перешкоджало наростанню рівня глутамату в сітківці ока у гострому постконтузійному періоді, без суттєвих міжгрупових відмінностей. Зокрема, рівень глутамату в сітківці у щурів в групі контузія+амантадин був достовірно нижчим в 1,67 рази, а щурів в групі контузія+мемантин - нижчим у 1,52 рази, ніж у тварин групи контузія+0,9% NaCl, відповідно (рис. 4.24). По відношенню до інтактних кролів, рівень глутамату у кролів, лікованих амантадином чи мемантином, залишився достовірно вищим в 1,21 та 1,32 рази, відповідно. Отже, за антиексайтотоксичним ефектом при контузії ока амантадину сульфат в дозі 5 мг/кг в/в та мемантин в дозі 20 мг/кг в/шл виявились практично зіставними.

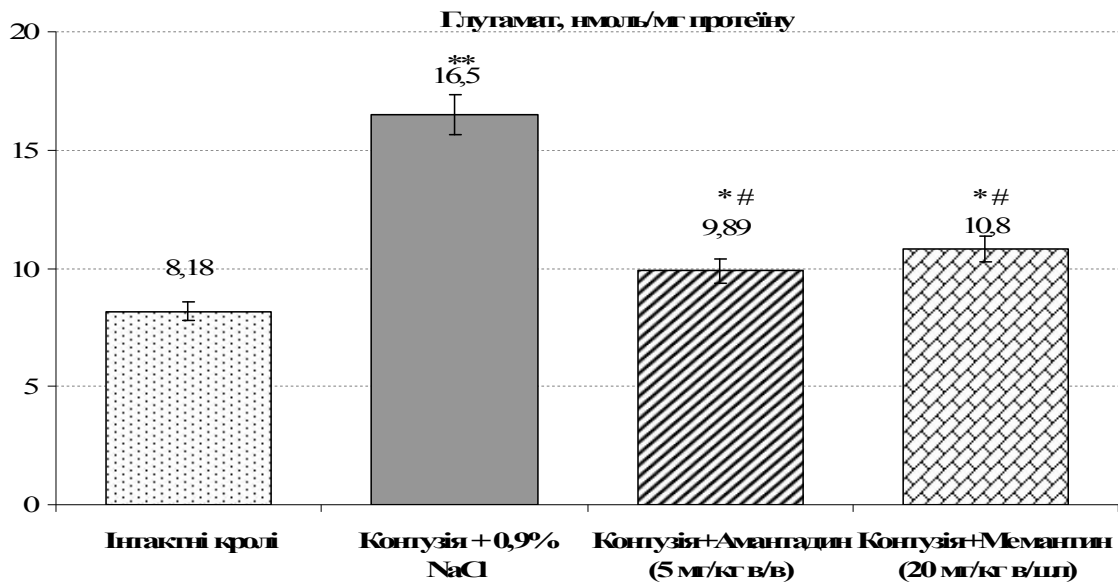


Рис. 4.24. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на рівень глутамату в сітківці кролів з модельною контузією ока ($n=6$, $M\pm m$). Достовірність відмінностей відносно групи інтактні кролі - * ($p<0,05$), ** ($p<0,001$); контузія + 0,9% NaCl - # ($p<0,05$).

Таким чином, постконтузійне ушкодження сітківки ока характеризується виразними ознаками енергодефіциту, оксидативного та нітрозативного стресу, глутаматної ексайтотоксичності у гострому періоді, які істотно поглиблюються через 7 діб після травми. За травматичного ушкодження зорового аналізатору адамантану сульфат перевершує мемантин за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати активність процесів пероксидації ліпідів та білків, підвищувати антиоксиданту активність за рахунок глутатіонпероксидази. За здатністю коригувати рівень нітратів та нітритів та зменшувати рівень глутамату в сітківці ока у гострому постконтузійному періоді адамантан зіставляється з мемантином.

4.3 Зв'язок маркерів нейроретинодеструкції з метаболічними змінами в сітківці за ішемічного й травматичного ураження зорового аналізатора та за дії модуляторів NMDA-рецепторів

На наступному етапі ми проаналізували можливі зв'язки біохімічних маркерів нейроретинодеструкції та метаболічних показників за ішемічного та постконтузійного ушкодження сітківки та в умовах модуляції активності NMDA-рецепторів. Аналіз кореляційних зв'язків між сироватковими маркерами нейроретинодеструкції та біохімічними показниками сітківки за ішемічного та постконтузійного ушкодження ока виявив статистично значущі закономірності (табл. 4.1). Виявилось, що за умов ішемічного ушкодження зорового аналізатору між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці виявляється найбільш сильний прямий кореляційний зв'язок ($r=0,72$). Цей факт є свідченням тригерної ролі глутаматної ексайтотоксичності в пошкодженні нейронів сітківки за умов ішемії/реперфузії. Достовірний обернений зв'язок виявлявся між рівнем NSE та рівнем АТФ ($r=-0,62$), що свідчить про внесок мітохондріальної дисфункції та енергодефіциту у процеси деструкції нейронів сітківки за ішемічного ураження зорового аналізатора. Рівень NSE достовірно прямо корелював з маркером ліпопероксидації – рівнем МДА та метаболітами NO ($r=0,52$; $0,51$), але менш тісно асоціювався з рівнем КГП та активністю глутатіонпероксидази ($r=0,45$; $-0,46$). В той же час, модулятор апоптозу та проліферації гліальних клітин білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ($r=0,65$; $0,64$) й обернено – з активністю глутатіонпероксидази ($r=-0,54$), тобто виявлявся асоціативний зв'язок із іншими чинниками, залученими до розвитку апоптозу в клітинах сітківки.

За умов травматичного ушкодження зорового аналізатору найбільш сильний прямий зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та маркерами оксидативного та нітрозативного стресу в сітківці ($r=0,66-0,78$), в той час як з рівнем глутамату зв'язок був менш сильним ($r=0,56$). Сильний

обернений зв'язок виявлявся між рівнем NSE та вмістом АТФ ($r=-0,70$). Виявлені асоціації є свідченням тригерної ролі чинників первинної альтерації нейронів сітківки за умов контузійної травми ока із вторинним включенням глутаматної ексайтотоксичності. За умов контузійної травми ока білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ($r=0,68$; $0,66$) й обернено – з активністю глутатіонпероксидази ($r=-0,56$), що засвічує вагомість вказаних чинників у промотуванні процесу апоптичної загибелі клітин сітківки, в тому числі і світлочутливих елементів.

Таблиця 4.1

Кореляційні зв'язки між сироватковими маркерами нейроретинодеструкції та біохімічними показниками сітківки за ішемічного чи постконтузійного ушкодження ока та за дії модуляторів NMDA-рецепторів (r)

Показники	Ішемічне ушкодження зорового аналізатора (n=14)		Травматичне ушкодження зорового аналізатора (n=12)	
	NSE	Білок S100	NSE	Білок S100
Модель				
АТФ	-0,62*	-0,46	-0,70*	-0,46
МДА	0,52*	0,48	0,78*	0,48
КГП	0,45	0,64*	0,66*	0,66*
ГПО	-0,46	-0,54*	-0,48	-0,56*
Метаболіти NO	0,51*	0,58*	0,68*	0,57*
Глутамат	0,72*	0,65*	0,56*	0,68*
Модель+модулятори NMDA-рецепторів				
АТФ	-0,42	-0,33	-0,32	-0,28
МДА	0,35	0,36	0,32	0,30
КГП	0,31	0,46	0,31	0,26
ГПО	-0,32	-0,34	-0,33	-0,34
Метаболіти NO	0,35	0,42	0,31	0,32
Глутамат	0,38	0,31	0,28	0,26

Примітка. Достовірність коефіцієнта кореляції r - * - $p<0,05$.

При застосуванні модуляторів NMDA-рецепторів (амантадину та мемантину) кореляційні зв'язки між рівнем глутамату, маркерами

оксидативного та нітрозативного стресу, маркерами енергодефіциту втрачали вірогідність і зменшувались за силою як за ішемічного, так і за травматичного ушкодження зорового аналізатора. Таким чином, фармакологічні інгібітори NMDA-рецепторів ефективно та комплексно коригують несприятливий метаболічний патерн в сітківці за умов ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора, а інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат можна розглядати як препарат-лідер щодо корекції метаболічної складової нейроретинопротекції.

Висновки до розділу 4

1. Ішемічне ураження зорового аналізатора у щурів характеризується зниженням рівня АТФ (в 2,6 рази, $p < 0,001$), підвищенням рівнів МДА, КГП, нітратів та нітритів, глутамату (в 2,4-2,7 рази, $p < 0,001$), зниженням активності глутатіонпероксидази (в 2,4 рази, $p < 0,001$) станом на 1-шу добу із достовірною, але слабкою деескалацією вказаних змін (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,05$) на 7-му добу після відновлення кровообігу. За травматичного ураження зорового аналізатора також виявляється енергодефіцит, ознаки оксидативного та нітрозативного стресу, підвищення рівня глутамату в сітківці станом на 1-шу добу із поглибленням (в 1,3-1,5 рази, $p < 0,05$) всіх виявлених порушень станом на 7-му добу.

2. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів зменшує метаболічні порушення в сітківці ока за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора, при цьому амантадину сульфату (5 мг/кг в/в) перевершує мемантин (20 мг/кг в/шл) в 1,2-1,5 рази ($p < 0,05$) за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати активність процесів ліпопероксидації та окисної модифікації білків, відновлювати антиоксиданту активність глутатіонпероксидази. Амантадину сульфат зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівень метаболітів NO та зменшувати рівень глутамату в сітківці ока за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора у тварин.

3. За ішемічного ушкодження зорового аналізатора найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці ($r=0,72$, $p<0,05$), в той час як зв'язок з іншими метаболічними маркерами був середньої сили ($r=|0,45-0,62|$, $p<0,05$). За травматичного ушкодження зорового аналізатору, навпаки, найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та вмістом АТФ ($r=-0,70$), маркерами оксидативного та нітрозативного стресу в сітківці ($r=0,66-0,78$ $p<0,05$), а з рівнем глутамату зв'язок був середньої сили ($r=0,56$ $p<0,05$). Білок S100 найбільш сильно корелює з рівнем глутамату, КГП, активністю глутатіонпероксидази ($r=|0,56-0,68|$, $p<0,05$) як за ішемічного, так і за травматичного ураження зорового аналізатора. За дії модуляторів NMDA-рецепторів асоціації між маркерами нейроретинодеструкції та метаболічними змінами в сітківці ока зменшуються за силою та втрачають статистичну значущість.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[14, 20, 33, 172]

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Глутаматна ексайтотоксичність відіграє провідну роль в ураженні зорового аналізатора при ішемії, глаукомі [202], вторинній альтерації сітківки на тлі хірургічних втручань [62, 115]. Підвищення рівня глутамату та гіперактивація NMDA-рецепторів призводить до ушкодження гангліонарних клітин сітківки внаслідок ініціації оксидативного стресу, апоптозу, запальної реакції [131, 156]. Зазначені процеси являють собою провідний напрямок, у колі якого є сенс впроваджувати заходи, спрямовані на реалізацію засад первинної нейроретинопротекторної терапії. В окремих роботах засвідчено, що інгібітор NMDA-рецепторів мемантин справляє нейропротективний ефект при експериментальному ураженні сітківки ока [40, 212]. Залишається невивченим вплив модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів на метаболічні процеси в сітківці ока за цих патологічних станів.

Тому метою дисертаційного дослідження було встановити роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження ока і на цій основі експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції патології зорового аналізатора.

Дослідження включало три основних етапи: на 1-му етапі було вивчено дозозалежний вплив фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів (блокатору поліамінового сайту амантадину, блокатору фенциклідинового сайту мемантину, блокатору іонного каналу магнію сульфату) на біохімічні маркери нейродеструкції - рівень нейронспецифічної енолази та білка S100 в сироватці крові за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів (розділ 3.1) та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів (розділ 3.3); на 2-му етапі було досліджено вплив модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів на цитометричні маркери апоптозу, нейрогліопрولیферативної активності та мікроциркуляцію сітківки за ішемічного та травматичного

ураження зорового аналізатора у тварин (розділи 3.2, 3.3, 3.4); на 3-му етапі досліджений вплив модуляції NMDA-рецепторів на метаболічні зміни (оксидативний стрес, енергодефіцит, стан системи оксиду азоту) в сітківці та оцінений їх зв'язок з маркерами нейродеструкції за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора (розділ 4).

Досліди проведені на 272 білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар масою 160-190 г та 156 кролях-самцях породи Шиншила масою 3,0-3,9 кг. Тварини перебували в стандартних умовах віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова, воду і корм отримували *ad libitum*, на групи розподілялись по 6-7 особин в кожній. Під час роботи з тваринами дотримані рекомендації Державного фармакологічного центру МОЗ України і біоетичні норми згідно Першого національного конгресу України з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин» (Страсбург, 1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин проводили в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг внутрішньоочеревинно).

Ішемічне ураження зорового аналізатора у щурів моделювали шляхом створення однобічної ішемії-реперфузії (IP) в басейні а. *ophthalmica*, яку викликали накладанням ретробульбарної лігатури на ліве око тварини із затягуванням до зникнення кровотоку на 60 хв. Потім ретробульбарні лігатури обережно знімали і кровообіг в басейні а. *ophthalmica* відновлювався. Контролем слугувала група псевдооперованих щурів, яким накладали ретробульбарні лігатури без наступного затягування. Травматичне ураження зорового аналізатора у кролів викликали дією потоку вуглекислого газу під тиском, що створювали за допомогою пневматичного пістолету [Патент №109789]. Модулятори NMDA-рецепторів вводили упродовж 7 діб (1 раз на добу) до та через 30 хвилин після накладання ретробульбарної лігатури на а. *ophthalmica* або через 30 хвилин після контузії ока. Через 24 години або 7 діб після моделювання патології (залежно від

мети експерименту - скринінг чи оцінка лікувальної ефективності) проводили енуклеацію та вилучали біологічний матеріал для біохімічних та цитомеричних досліджень (розділ 2).

Спершу ми оцінили вплив ІР ока на сироватковий вміст нейронспецифічної енолази (NSE), що є чутливим та специфічним маркером альтерації нейронів [102]. NSE експресується в нейронах, астроцитах, олігодендроцитах, регулює нейрональну та гліальну активність і за високих концентрацій може стимулювати експресію прозапальних цитокінів, індукувати апоптоз [102]. Встановлено (рис. 3.1), що через 24 години після відтворення моделі ІР ока у щурів в сироватці крові реєструвалось багаторазове (в 11,4 рази, $p < 0,05$) зростання рівня NSE. Цілком очевидно, що ступінь підвищення рівня NSE через 24 години після ішемії/реперфузії тканин ока може детермінувати перебіг постреперфузійного ураження сітківки та зорового нерву в подальшому, оскільки цей ензим має прозапальні та проапоптичні властивості. З цієї точки зору, найбільш важливим є досягнення деескалації рівня NSE упродовж першої доби ішемічного ураження зорового аналізатору. Тому вплив модуляторів активності NMDA-рецепторів на рівень NSE в сироватці крові оцінювався через 24 години після постреперфузійного ураження зорового аналізатору. З цією метою були застосовані фармакологічні блокатори різних сайтів NMDA-рецепторів - блокатор фенциклідинового сайту мемантин, блокатор поліамінового сайту амантадину сульфат, блокатор іонного каналу магнію сульфат. Досліджувані засоби вводили одноразово в лікувальному режимі - через 30 хвилин після накладання ретробульбарної лігатури, в подальшому - 1 раз на добу. Спочатку був проведений етап скринінгу із застосуванням препаратів у дозах, які були апробовані у щурів при різних патологічних процесах у мозку і визнані достатніми для блокування активності NMDA-рецепторів (див. розділ 2). Згідно рекомендацій з доклінічної оцінки сполук з цито- та органопротекторною активністю при скринінгу умовно-ефективної дози необхідно провести дослідження у діапазоні доз, що є в 1,5-2 рази

вищими та нижчими від дози, для котрої вперше встановлений максимальний захисний ефект [3].

Дослідження вплив мемантину на динаміку нейроретинодеструкції за рівнем NSE в сироватці крові (табл. 3.1) показало, що найбільший ефект спостерігався при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг – за цих умов у щурів з ІР станом на 1-шу добу рівень NSE був достовірно нижчим на 64,0 %. В той же час, при введенні мемантину в дозах 10 мг/кг та 40 мг/кг зниження сироваткового рівня NSE у щурів з ІР ока становило 25,6 % та 40,1 % відносно групи контрольної патології.

Застосування амантадину сульфату справляло дозозалежний ефект на рівень NSE в сироватці крові у щурів з моделлю ІР ока (табл. 3.2). Найбільший нейроретинопротекторний ефект спостерігався при застосуванні амантадину сульфату у дозі 5 мг/кг – станом на 1-шу добу у щурів з ішемічним ураженням ока рівень NSE був достовірно нижчим на 83,5 % відносно щурів з контрольною патологією. При введенні амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 10 мг/кг зниження сироваткового рівня NSE у щурів з ІР ока становило 65,6 % та 39,7 % відносно групи контрольної патології.

Введення магнію сульфату також викликало деескалацію рівня NSE в сироватці крові у щурів з моделлю ІР ока (табл. 3.3). Найбільш значуще зменшення сироваткового рівня NSE у постреперфузійний період стримувало доведення введення магнію сульфату у дозі 250 мг/кг: за цих умов рівень NSE у щурів з ІР ока був на 66,0 % нижчим, ніж в групі контрольної патології. У щурів, що отримали препарат у дозі 150 мг/кг, рівень NSE був достовірно нижчим на 19,6 %, ніж у щурів в групі ІР+0,9% NaCl.

В подальшому ми оцінили вплив ІР ока на рівень білка S100 в сироватці крові, який є зраним біохімічним маркером нейроапоптозу та нейрогліопрولیферативної активності [150, 194]. Білок S100 експресується в гліальних клітинах, переважно астроцитах, належить до кальцій-, мідь- та цинк-зв'язуючих білків [126], залучений до Ca²⁺-залежної активації

гуанілатциклази (в тому числі і в клітинах сітківки ока) [82, 208], дофамінового сигналіngu через взаємодію з D2-рецепторами дофаміну [149]. За низьких концентрацій білок S100 виявляє трофічний потенціал, а за високих - проапоптичну, прозапальну та нейродегенеративну дію [126].

З'ясувалось (рис. 3.3), що 60-хвилинне накладання ретробульбарної лігатури зумовило значуще підвищення вмісту білка S100 в сироватці крові через 24 години – його рівень перевищував показники інтактних та псевдооперованих тварин в 18-20 разів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,90$, $p=0,002$). В той же час через 7 діб після ішемії ока відмічалось істотне поглиблення постішемічних нейродегенеративних процесів в сітківці ока та зоровому нерві. Так, рівень білка S100 у дослідних щурів з моделлю IP на 7-му добу був вищим в 32,6 рази, ніж у псевдооперованих щурів та в 1,73 рази, ніж у гострому постреперфузійному періоді (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,88$, $p=0,002$). Високий рівень білка S100 в сироватці крові щурів через тиждень після реперфузії ока може бути наслідком дисбалансу механізмів вторинної альтерації, проліферативних та репаративних процесів в сітківці ока. Очевидно, що ефективність нейроретинопротекції може визначатись здатністю фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів стримувати ескалацію білка S100 упродовж першого тижня після ішемічного ураження зорового аналізатору.

Застосування в умовах модельної IP ока блокаторів NMDA-рецепторів (мемантину, амантадину сульфату, магнію сульфату) в умовно ефективних дозах забезпечувало деескалацію рівня білка S100 станом на 7-му добу, однак ступінь зниження показника суттєво відрізнявся (табл. 3.4). Так, застосування мемантину дозою 20 мг/кг в/ш перешкоджало ескалацію рівня білка S100 відносно фонових значень: рівень показника був нижчим в 2,88 рази порівняно із таким у щурів групи контрольної патології. Введення магнію сульфату 250 мг/кг в/в також перешкоджало зростанню рівня білка S100 на 7-му добу постреперфузійного ураження зорового аналізатора:

вказаний маркер був достовірно нижчим в 3,24 рази порівняно з таким в групі контрольної патології. Найбільш виразний нейроретинопротекторний та антипроліферативний ефект справляло введення амантадину сульфату 5 мг/кг в/в, адже у щурів цієї групи рівень білка S100 був нижчим в 13,1 рази, ніж у щурів в групі контрольної патології, а також в 4,53 та 4,04 рази нижчим, ніж у щурів, що отримали мемантин 20 мг/кг в/шл та магнію сульфат 250 мг/кг в/в, відповідно.

Додаткові докази закономірностей, виявлених при біохімічному дослідженні, були отримані на підставі аналізу результатів протокової ДНК-цитометрії клітин сітківки. Результати наших досліджень засвідчили, що вже наприкінці першої доби постреперфузійного періоду спостерігалось підвищення кількості ретинальних клітин з ознаками апоптозу та наростала проліферативна активність ретинальних клітин (рис. 3.5 – 3.6). У щурів з моделлю ІР ока через 24 години відсоток клітин в фазі SUB-G0G1 був достовірно вищим в 20-21 рази, ніж у інтактних та псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$). За цих умов відсоток клітин в фазі S достовірно перевищував показники інтактних та псевдооперованих щурів у 7 - 8 разів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=2,87$, $p=0,002$). Станом на 7-му добу у щурів з ІР ока частка клітин в фазі SUB-G0G1 була нижчою в 1,37 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=1,08$, $p=0,31$), але залишалась значимо вищою (в 14,8 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$). Подібні зміни відмічались і з показником проліферативної активності: частка клітин в фазі S була нижчою в 1,15 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=1,34$, $p=0,209$), але залишалась значимо вищою (в 6,0 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований $U=3,13$, $p=0,001$).

Здатність модуляторів NMDA-рецепторів впливати на механізми загибелі нейроретиноцитів у гострому періоді може детермінувати перебіг

ремоделювання ушкоджених структур зорового аналізатора в подальшому. Тому на наступному етапі була проведена порівняльна оцінка впливу мемантину, адамантану сульфату та магнію сульфату на показники фаз SUB-G0G1 та S клітинного циклу сітківки. Виявилось, що всі досліджувані блокатори NMDA-рецепторів у застосованих дозах сприяли зменшенню відносної кількості ретиноцитів, які перебувають у фазах SUB-G0G1 та S клітинного циклу, однак ступінь зниження даного показника істотно відрізнявся залежно від застосованого препарату (табл. 3.5 – 3.6). Реалізацію найбільш потужного антиапоптотичного та антипроліферативного ефекту на клітини сітківки забезпечувало застосування амантадину сульфату дозою 5 мг/кг – його введення супроводжувалось зменшенням кількості клітин у фазах SUB-G0G1 та S відповідно в 3,03 та 3,38 разів відносно групи контрольної патології. Застосування магнію сульфату (250 мг/кг в/в) призводило до зменшення відсотку клітин, які перебувають у фазах SUB-G0G1 та S, відносно цього ж показника групи контрольної патології, відповідно в 2,57 та 2,42 рази, тоді як введення мемантину (20 мг/кг в/шл) супроводжувалось зниженням цих показників лише в 1,62 та 1,54 рази. Таким чином, за антиапоптотичною та антипроліферативною активністю досліджувані інгібітори NMDA-рецепторів можна розмістити в наступній послідовності: амантадину сульфат (5 мг/кг в/в) > магнію сульфат (250 мг/кг в/в) > мемантин (20 мг/кг в/ш).

В подальшому ми оцінили нейроретинопротекторний потенціал модуляторів NMDA-рецепторів за травматичного ушкодження зорового аналізатора на моделі стандартизованої контузії ока у кролів. Нами показано (табл. 2.2), що лише магній сульфат (250 мг/кг в/в) викликав вірогідне зменшення внутрішньоочного тиску (ВОТ) у інтактних кролів, що є небажаним при травмі ока. Отримані дані стали підставою для вилучення магній сульфату із дизайну дослідження.

Вивчення біохімічних маркерів нейроретинодеструкції – рівнів NSE та білка S100 у дослідних тварин з травматичним ушкодженням зорового

аналізатора засвідчило їх значне підвищення у гострому та підгострому постконтузійному періоді із певними особливостями (рис. 3.6). За цих умов у кролів відмічалось достовірне зростання сироваткових рівнів NSE (на 1-шу та 7-му добу в 43,4 та 42,3 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (на 1-шу та 7-му добу в 20,5 та 38,8 рази, $p < 0,001$) відносно інтактних тварин. Терапевтичне застосування в умовах контузії ока блокаторів поліамінового та фенциклідинового сайту NMDA-рецепторів сприяло деескалації рівнів NSE та білка S100 із певними особливостями (табл. 3.7 – 3.8). Так, найменший ефект спостерігався при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг – за цих умов у тварин з контузією ока рівень NSE (станом на 1-шу добу) був достовірно нижчим на 37,3 %, а рівень білка S100 (станом на 7 добу) в сироватці крові - на 34,7 %, ніж в групі контрольної патології. При введенні амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг зниження рівня NSE у кролів з контузією ока становило 47,2-52,2 %, а білка S100 - 42,7-48,0 % відносно групи контрольної патології. Отже, найменший ефект спостерігався при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг, дещо більший у амантадина сульфат в дозі 2,5 мг/кг і найбільший у амантадина сульфат в дозі 5 мг/кг.

В подальшому на моделі травми ока був оцінений вплив амантадину та мемантину на показники клітинного циклу. Виявилось (рис. 3.7 – 3.8), що за умов контузії ока у кролів частки клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 та у фазі S були вищими в 14,6 та 4,41 рази станом на 1-шу добу; в 10,0 та 7,70 разів - на 7-му добу ($p < 0,001$). Застосування блокаторів NMDA-рецепторів супроводжувалось зменшенням активності процесів нейроретиноапоптозу та нейрогліопроліферації, однак виразність цього ефекту була вищою у амантадину, порівняно з мемантином (табл. 3.9 – 3.10). Так, при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг в/шл у тварин з контузією ока через 24 години відсоток клітин із ознаками фрагментації ДНК (у фазі SUB-G0G1) та ознаками реплікації ДНК (у фазі S) був достовірно нижчим відповідно на 25,1 та 25,3 %, ніж в групі контрольної патології. Введення амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в у кролів з модельною контузією ока

забезпечувало зниження частки клітин у фазі SUB-G0G1 на 51,1 % та 60,3 %, а у фазі S на 44,0 % та 58,7 % відносно кролів групи контрольної патології.

Відомо, що застосування в постконтузійний, або постреперфузійний період ураження зорового аналізатора засобів, які спроможні відновлювати та покращувати перфузію ока, є перспективним направленням сучасної нейроретинопротекції. Саме тому, зважаючи на результати попередніх досліджень було доцільним, використовуючи метод лазерної доплерографії у гострий постреперфузійний період ретинальної ішемії у щурів та контузійної травми ока у кролів дослідити вплив блокаторів NMDA-рецепторів на повноту відновлення кровоплину в судинах мікроциркуляторного русла басейну а. ophthalmica. Виявилось, що на тлі ішемії ока відмічалось зниження коефіцієнта мікроциркуляції (КМ) в 39,2 рази, відносно фонового рівня (табл. 3.11). В постреканалізаційному періоді також реєструється суттєва гіпоперфузія (КМ виявився достовірно меншим порівняно із його фоновим значенням у середньому в 3,3 рази), що свідчить про формування синдрому невідновленого кровоплину. Поряд з цим за умов травматичного ураження зорового аналізатора також відмічається сповільнення кровотоку в судинах ока, про що свідчить значне зниження коефіцієнта мікроциркуляції відносно фонових значень в середньому в 8,2 рази (табл. 3.12).

Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази, $p < 0,05$) мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді із максимальним ефектом у амантадину сульфату (5 мг/кг в/в). За здатністю амортизувати судинні розлади модулятори NMDA-рецепторів розташовуються наступним чином - амантадину сульфат $>$ мемантин. Покращання перфузії заднього полюсу очного яблука на тлі застосування модуляторів активності NMDA-рецепторів, і в першу чергу блокаторів поліамінового сайту, може бути одним із вагомих механізмів нейроретинопротекторної дії. Очевидно, що мемантин та амантадину сульфат нормалізують мікроциркуляцію опосередковано, через зменшення проявів глутаматної ексайтотоксичності,

яка є ключовою патогенетичною ланкою у розвитку деструктивно-дегенеративних змін в гангліозних шарах сітківки. Не виключаються і інші механізми реалізації судинних ефектів модуляторів NMDA-рецепторів, адже мемантин може підвищувати позаклітинну концентрацію допаміну, інгібувати вивільнення ацетилхоліну, блокувати 5-гідрокситриптамінові рецептори третього типу (5-ГТ₃) венул ока [174], що може інтенсифікувати мікроциркуляцію, покращувати відтік венозної крові та зменшувати венозне повнокрів'я, створюючи умови для нормалізації мікроциркуляції в сітківці ока. Ці механізми можуть сприяти зменшенню набряку, який викликає стиснення судин зовні (особливо за умов контузії ока), порушуючи тим самим кровоплин.

Отже, модулятори NMDA-рецепторів викликають дозозалежну деескалацію маркерів нейродеструкції (рівнів NSE та білка S100 в сироватці крові), амортизують апоптичні, нейрогліопроліферативні, мікроциркуляторні розлади за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору. При цьому найбільшу ефективність щодо корекції вказаних процесів в сітківці ока виявляє інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат у дозі 5 мг/кг в/в, а у дозі 2,5 мг/кг в/в цей засіб зіставлявся з інгібітором фенциклідинового сайту мемантином у дозі 20 мг/кг в/шл, відповідно. Тому далі був вивчений вплив саме цих модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни (оксидативний стрес, енергодефіцит, стан системи оксиду азоту) в сітківці за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів. Також було вивчено питання щодо можливого зв'язку метаболічних порушень зі змінами біохімічних та цитометричних маркерів нейроретинодеструкції, апоптозу та нейрогліопроліферативної активності сітківки.

Результати наших досліджень засвідчили, що через 24 години після ІР в сітківці ока щурів виявлялись ознаки енергодефіциту, оксидативного та нітрозативного стресу, зниження активності антиоксидантної системи на фоні підвищення рівня глутамату (рис. 4.1; 4.3; 4.5; 4.7; 4.9; 4.11). Так, у

щурів групи 2 (контрольна патологія) в сітківці рівень АТФ був нижчим в 2,42 рази, рівень МДА та КГП - вищим в 2,57 та 2,52 рази, активність глутатіонпероксидази - нижчою в 2,34 рази, вміст метаболітів NO (нітратів та нітритів) - вищим в 3,37 рази, а рівень глутамату - вищим в 2,03 рази, ніж у псевдооперованих щурів групи 1 ($p < 0,01$). Через 7 діб після ІР всі метаболічні порушення в сітківці ока зменшувались, але їх регрес був незначним – в межах 10-20% і ознаки енергодефіциту, оксидативно-нітрозативного стресу, пригнічення антиоксидантної активності та накопичення глутамату у сітківці залишались статистично значущими порівняно із псевдооперованими тваринами.

Виявлені метаболічні зрушення в сітківці ока на тлі ІР відіграють важливу роль в патогенезі загибелі нейронів. Так, накопичення карбонільованих дериватів білків поглиблює порушення протеостазу, знижує вітальність нейрональних клітин та промотує нейроапоптоз [74, 75]. Особливу роль у контролі активності ПОЛ в ретинальних фоторецепторах та ретинальному пігментному епітелії відіграє антиоксидантний ензим глутатіонпероксидаза, що здатний відновлювати комплекси ліпідних гідропероксидів, інкорпорованих в біомембрани та ліпопротеїни зорового аналізатора [179, 201]. Глутатіонпероксидаза (зокрема, ізоензим GPx4) є одним із ключових чинників, який детермінує вітальність фоторецепторних клітин сітківки та запобігає нейроапоптозу [179, 201].

Поряд з оксидативним стресом за умов ІР завжди виникає нітрозативний стрес у відповідь на гіперпродукцію нітроген монооксиду (NO) за участі індукцибельної NO-синтази гліальними клітинами [69, 124]. Взаємодія NO з реакційно-здатними кисневими дериватами викликає утворення реакційно активного пероксинітриту, який володіє потужними мембранотоксичними властивостями, викликаючи модифікацію структурних та регуляторних білків, нуклеїнових кислот, ліпідів. Модуляція продукції NO регулює розвиток апоптозу в сітківці ока [133].

Патобіохімічною основою загибелі нейрональних клітин, в тому числі і в сітківці ока, вважають феномен глутаматної ексайтотоксичності. Глутамат є первинним ретинальним нейротрансмітером, екстрацелюлярна акумуляція якого спричиняє гіперактивацію іонотропних глутаматних рецепторів (AMPA та NMDA) із наступним неконтрольованим надходженням Ca^{2+} у постсинаптичні нейрони та ініціацією апоптичної загибелі клітин [160].

Застосування фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів – інгібітору поліамінового сайту (амантадину) та інгібітору фенциклідинового сайту (мемантину) достовірно зменшувало біохімічні зміни в сітківці ока щурів з ішемічним ураженням зорового аналізатора (рис. 4.2; 4.4; 4.6; 4.8; 4.10; 4.12) Так, застосування амантадину сульфату та мемантину стримувало розвиток мітохондріальної дисфункції і запобігало зниженню АТФ в сітківці практично з однаковою ефективністю: у щурів в групах 3 (IP+амантадин) та 4 (IP+мемантин) рівень АТФ був вищим у 1,66 і 1,50 рази, ніж у щурів групи 2 ($p < 0,05$), відповідно, але залишався нижчим в 1,46 та 1,61 рази, ніж у щурів групи 1 ($p < 0,05$). За умов IP ока застосування модуляторів NMDA-рецепторів викликало деескалацію ознак оксидативного та нітрозативного стресу, сприяло відновленню антиоксидантної активності, зниженню рівня глутамату, при цьому ефект інгібітору поліамінового сайту за окремими показниками був більшим, ніж у інгібітору фенциклідинового сайту: у щурів групи 3 (IP+амантадин) рівні МДА, КГП, нітратів та нітритів, глутамату були нижчими й активність глутатіонпероксидази була вищою в 2,14; 2,0; 1,83; 1,61 та 1,74 рази, а у щурів групи 4 (IP+мемантин) – в 1,81; 1,67; 1,64; 1,53 та 1,42 рази, відповідно, ніж у щурів групи 2 ($p < 0,05$). За умов IP за здатністю коригувати рівень МДА, КГП, підвищувати активність глутатіонпероксидази, амантадин достовірно перевершував мемантин в середньому в 1,2-1,5 рази ($p < 0,05$).

Травматичне ушкодження зорового аналізатора у кролів також характеризувалось формуванням виразних метаболічних розладів в гострому посттравматичному періоді. Через 24 години після контузії ока в сітківці

кролів рівень АТФ був нижчим в 2,1 рази, рівні МДА, КГП, нітритів та нітратів, глутамату – вищими в 2,32; 3,56; 3,23 та 2,02 рази, активність глутатіонпероксидази – нижчою в 1,88 рази, ніж у інтактних тварин (рис. 4.13; 4.15; 4.17; 4.19; 4.21; 4.23). За постконтузійного ушкодження сітківки ока через 7 діб після травми відзначалось статистично значуще наростання ознак енергодефіциту, оксидативного та нітрозативного стресу, глутаматної ексайтотоксичності порівняно із гострим періодом. Такі зміни можуть вказувати на поглиблення мітохондріальної дисфункції на тлі вторинної альтерації та прогресування некробіозу та апоптозу клітинних елементів сітківки та зорового нерва за контузійного ураження ока, і узгоджуються зі змінами біохімічних та цитометричних маркерів нейродеструкції та апоптозу. Отже, за умов контузії ока ретинопротекторний потенціал модуляторів NMDA-рецепторів повинен найбільш повно реалізуватись у гострому періоді, щоб амортизувати вторинні нейродеструктивні процеси.

Застосування амантадину та мемантину забезпечувало деескалацію біохімічних змін в сітківці кролів з травматичним ушкодженням зорового аналізатора (рис. 4.14; 4.16; 4.18; 4.20; 4.22; 4.24). При цьому амантадин більш ефективно стримував розвиток енергодефіциту та оксидативного стресу, ніж мемантин, і зіставлявся з ним за здатністю коригувати рівень метаболітів NO та глутамату.

Аналіз кореляційних зв'язків між сироватковими маркерами нейроретинодеструкції та біохімічними показниками сітківки за ішемічного та постконтузійного ушкодження ока виявив статистично значущі закономірності (табл. 4.1). Виявилось, що за умов ішемічного ушкодження зорового аналізатору між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці виявляється найбільш сильний прямий кореляційний зв'язок ($r=0,72$). Цей факт є свідченням тригерної ролі глутаматної ексайтотоксичності в пошкодженні нейронів сітківки за умов ішемії/реперфузії. Рівень NSE достовірно корелював з рівнем АТФ ($r=-0,62$, $p<0,05$), МДА та метаболітами NO ($r=0,52$; $0,51$, $p<0,05$), але менш тісно асоціювався з рівнем КГП та

активністю глутатіонпероксидази ($r=0,45$; $-0,46$, $p=0,1$). В той же час, модулятор апоптозу та проліферації гліальних клітин білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ($r=0,65$; $0,64$, $p<0,05$) й обернено – з активністю глутатіонпероксидази ($r=-0,54$, $p<0,05$), тобто виявлявся асоціативний зв'язок із іншими чинниками, залученими до розвитку апоптозу в клітинах сітківки.

За умов травматичного ушкодження зорового аналізатору найбільш сильний прямий зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та маркерами оксидативного та нітрозативного стресу в сітківці ($r=0,66-0,78$, $p<0,05$), в той час як з рівнем глутамату зв'язок був менш сильним ($r=0,56$, $p<0,05$). Сильний обернений зв'язок виявлявся між рівнем NSE та вмістом АТФ ($r=-0,70$). Виявлені асоціації є свідченням тригерної ролі чинників первинної альтерації нейронів сітківки за умов контузійної травми ока із вторинним включенням глутаматної ексайтотоксичності. За умов контузійної травми ока білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ($r=0,68$; $0,66$) й обернено – з активністю глутатіонпероксидази ($r=-0,56$), що засвічує вагомість вказаних чинників у промотуванні процесу апоптичної загибелі клітин сітківки, в тому числі і світлочутливих елементів.

При застосуванні модуляторів NMDA-рецепторів (амантадину та мемантину) кореляційні зв'язки між рівнем глутамату, маркерами оксидативного та нітрозативного стресу, маркерами енергодефіциту втрачали вірогідність і зменшувались за силою як за ішемічного, так і за травматичного ушкодження зорового аналізатора.

Таким чином, модулятори поліамінового та фенціклідинового сайтів NMDA-рецепторів виявляли достовірний нейроретинопротекторний ефект і за рахунок метаботропного ефекту, що реалізувався як за ішемічного, так і за травматичного ушкодження зорового аналізатора у тварин. Інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат (5 мг/кг в/в) можна розглядати як препарат-лідер щодо корекції метаботропної складової нейроретинопротекції.

На основі результатів власних досліджень була створена схема біохімічних механізмів нейроретинодеструкції за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору та точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів (рис. 5.1).

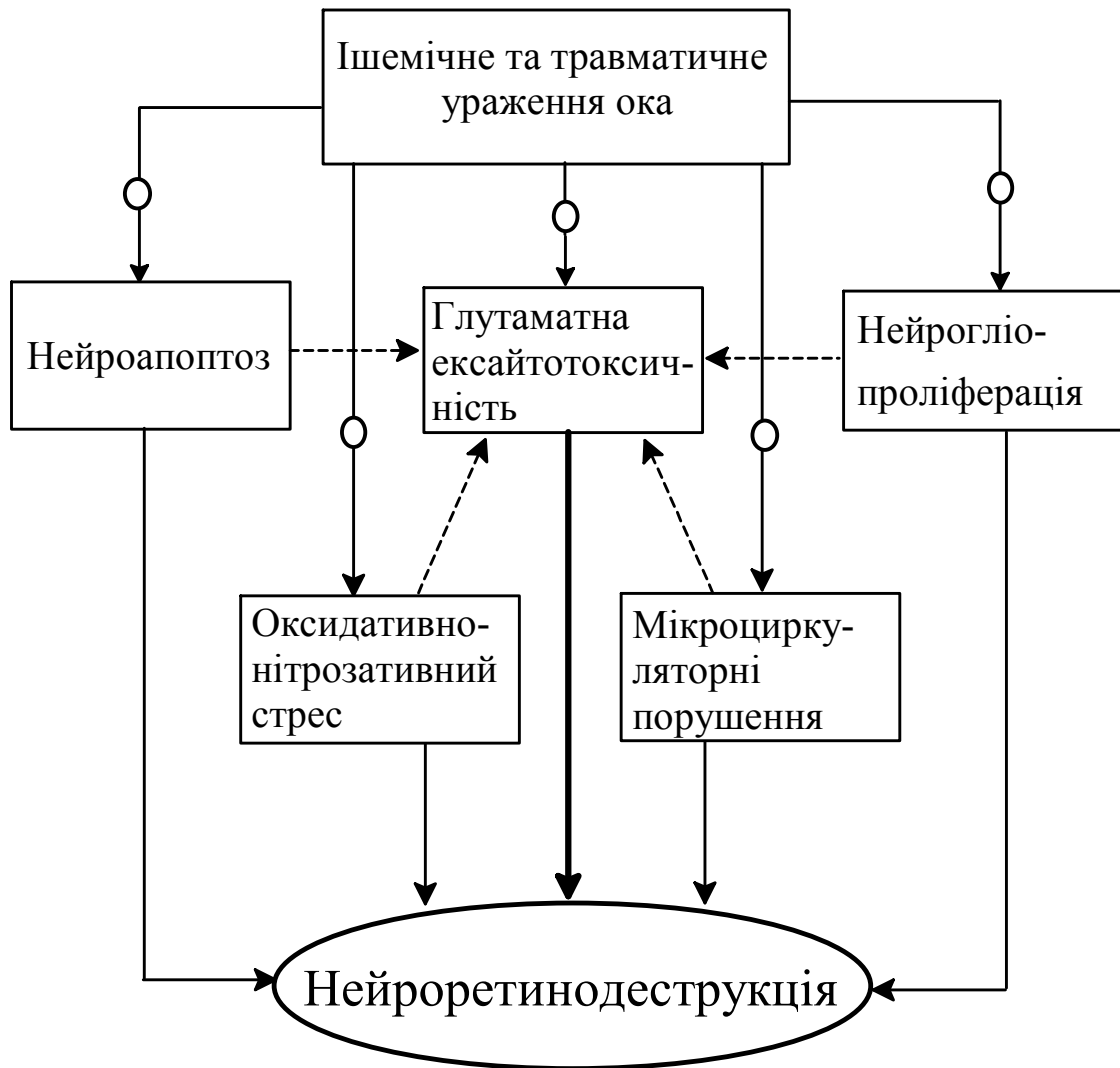


Рис. 5.1. Схема біохімічних механізмів нейроретинодеструкції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору та точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів. Примітки: 1. пунктирні стрілки - зв'язок між глутаматною ексайтотоксичністю та іншими механізмами нейроретинодеструкції; 2. ○ - точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукової задачі - на основі встановлення ролі модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора, експериментально обґрунтовані підходи до корекції нейроретинодеструктивних процесів за допомогою інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату.

1. Ураження зорового аналізатору ішемічного та травматичного генезу у тварин характеризується значущим підвищенням рівня маркерів нейродеструкції в сироватці крові - NSE (в 11,0 та 43,4 рази, $p < 0,001$) та білка S100 (в 8,4 та 20,5 рази, $p < 0,001$) упродовж 1-ої доби із подальшим персистуванням (за ішемії / реперфузії ока у щурів) чи ескалацією (за контузії ока у кролів) ознак нейроретинодеструкції через 7 діб. За ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало дозозалежне зниження рівнів NSE (в 2-6 рази, $p < 0,05$) та білка S100 (в 2-3 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату.
2. Ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатору у тварин асоціюється з підвищенням цитометричних маркерів апоптозу (клітин у фазі SUB-G0G1 - в 20,2 та 14,6 рази, $p < 0,001$), та нейрогліопроліферативної активності (клітин у фазі S в 7,1 та 4,41 рази, $p < 0,001$). За цих умов введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало зниження часток клітин у фазі SUB-G0G1 (в 1,6-2,6 рази) та фазі S (в 1,5-3,0 рази, $p < 0,05$) із максимальним ефектом у амантадину сульфату.

3. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази, $p < 0,05$) мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді. За здатністю амортизувати судинні розлади інгібітор поліамінового сайту амантадин сульфат перевершував інші модулятори NMDA-рецепторів.
4. Ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатора у тварин характеризується зниженням рівня АТФ (в 2,1-2,5 рази, $p < 0,001$), підвищенням (в 2,0-3,2 рази, $p < 0,001$) рівнів МДА, карбонільних груп протеїнів, нітратів та нітритів, глутамату, зниженням (в 1,7-2,4 рази, $p < 0,001$) активності глутатіонпероксидази в сітківці ока. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів зменшує метаболічні зміни в сітківці, при цьому амантадину сульфат перевершує мемантин в 1,2-1,5 рази ($p < 0,05$) за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати процеси ліпопероксидації та окисної модифікації білків, відновлювати активність глутатіонпероксидази, й зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівні глутамату та метаболітів NO в сітківці за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора у тварин.
5. За ішемічного ураження зорового аналізатора найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці ($r = 0,72$, $p < 0,05$), зв'язок з іншими метаболічними маркерами був середньої сили ($r = |0,45-0,62|$, $p < 0,05$). За травматичного ураження зорового аналізатору найбільш сильний зв'язок виявлявся між рівнем NSE та вмістом АТФ ($r = -0,70$), маркерами оксидативного та нітрозативного стресу ($r = 0,66-0,78$), зв'язок з рівнем глутамату був середньої сили ($r = 0,56$). Рівень білка S100 в крові корелює в сітківці з рівнем глутамату, карбонільних груп, активністю глутатіонпероксидази ($r = |0,56-0,68|$, $p < 0,05$) за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору. За дії модуляторів NMDA-рецепторів асоціації

між маркерами нейродеструкції та метаболічними змінами в сітківці ока зменшуються за силою та втрачають значущість ($r < |0,3|$). Для нейроретинопротекції більш перспективним засобом слід вважати інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алексеев В.Н., Корелина В.Е., Шаша Ч. Нейропротекция новым антиоксидантом Рексод при экспериментальной глаукоме // Клиническая офтальмология. 2008. 3. С. 82–83.
2. Бездетко П.А., Шилкина Д.И. К вопросу о нейропротекторном лечении передней ишемической оптической нейропатии // Таврический медико-биологический вестник. 2013. 16(3). С. 26-28.
3. Беленичев И.Ф., Черний В.И., Колесник Ю.М. [и др.] Рациональная нейропротекция // Д: Издательский дом Заславский, 2009. 348 с.
4. Веселовская З.Ф., Веселовская Н.Н. Современные аспекты нейропротекции в лечении хронической сосудистой патологии зрительного анализатора // Пробл. еколог. та мед. ген. і клін. імун.: Сб. науч. тр. Луганск. 2011. 4 (106). - С. 80-86.
5. Веселовская З.Ф., Веселовский Н.С., Веселовская Н.Н. Фундаментальные исследования в офтальмологии – результаты и перспективы в лечении хронической сосудистой патологии органа зрения // Таврический медико-биологический вестник. 2012. 15(3). С. 37-39.
6. Владимиров Ю.В., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.- М.: Наука, 1972. 252 с.
7. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Перслегина И.А. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. 1990. № 8. С. 19-22.
8. Громова О. А., Торшин И. Ю., Гусев Е. И. [и др.] Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе церебролизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот // Журнал "Трудный пациент". 2010. 4. 25-31.

9. Егоров Е.А., Брежнев А.Ю., Егоров А.Е. Нейропротекция при глаукоме: современные возможности и перспективы // Клиническая офтальмология. 2014. 2. С. 108-113
10. Егоров Е.А., Давыдова Н.Г., Романенко И.А. и др. Мексидол в комплексном лечении глаукомы // Клиническая офтальмология. 2011. 12(3). С. 107–109.
11. Жабоедова Н.В., Загорій Г.В., Ходаківський О.А. Скринінг церебропротекторних властивостей промислового зразка ампульного розчину 1-адаман-тилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (Адемол) на моделях гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом // Вісник морфології. 2016. 22(1). С. 83-87
12. Заїчко Н. В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізеном, індометацином, німесулідом // Вісник Вінницького державного медичного університету. 2003. №7 (2/2). С.664 - 666.
13. Карабань И.Н. Применение блокатора глутаматных рецепторов амантадина в неврологии // Международный неврологический журнал. 2012. 2(48). Режим доступа до журн.: http://www.mif-ua.com/archive/article_print/27331.
14. Комнацька К. М., Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Ходаківський О. А. Комплексний підхід до доклінічної оцінки безпечності нейроретинопротекторів при різних шляхах введення // Вісник морфології. 2015. 21(2). С. 379-385.
15. Коренман И.М. Методы определения органических соединений. - М.:Химия, 1975. 360с.
16. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
17. Кривонос О.В., Амосова Н.А., Смоленцева И.Г. Применение антагониста глутаматных NMDA-рецепторов ПК-Мерц в остром периоде инсульта // Журнал неврологии и психиатрии. 2009. 4. С. 72–74.

18. Николаев А.Я. Биологическая химия: ученик. – Москва: МИА, 2004. С. 453.
19. Никонов В.В., Савицкая И.Б. Роль антагонистов глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении повреждений мозга: обзор литературы // Медицина неотложных состояний. 2012. 6. С.5–8.
20. Повх В. Л. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні зміни в сітківці при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(1). С. 136-141.
21. Повх В. Л. Морфо-функціональна оцінка офтальмопротекторних ефектів мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при експериментальній перехідній ішемії ока // V Міжнар. науково-практична конференція молодих вчених: тези доп., м. Вінниця, 15–16 трав. 2014 р. В., 2014. С. 142-145.
22. Повх В. Л. Нейроретинопротекторні властивості модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні ока (експериментальне дослідження) // Вісник морфології. 2016. 22(1). С. 53-57.
23. Повх В. Л., Фоміна Л. В., Ходаківський М. А., Ходаківський О. А. Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюса ока після контузії або в гострий постреперфузійний період на тлі реканалізації а. ophthalmica // Буковинський медичний вісник. 2017. 1(81). С. 106-111.
24. Повх В. Л., Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка нейроретинопротекторної дії мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при контузійній травмі ока у кролів за активністю нейрон-специфічної енолази // Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, пам'яті професора В. В. Дунаєва : матеріали конф., м. Запоріжжя, 24-25 листоп. 2016 р. 3., 2016. – С. 63-64.

25. Повх В. Л., Ходаківський О. А., Ходаківський М. А. Порівняльна оцінка величини антиапоптотичного ефекту серед модуляторів активності NMDA-рецепторів в умовах модельної перехідної ішемії реперфузії ока за даними протоково-цитометричного аналізу // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2016. 4. С. 84-87.
26. Повх В. Л., Черешнюк І. Л., Ходаківський О. А., Попова О. І. Перспективи сучасної нейроретинопротекції – фокус на модулятори розвитку глутаматної ексайтотоксичності // Науково-практична конференція з міжнародною участю „Філатовські читання – 2016”, присвячена 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я : матеріали конф., м. Одеса, 19-20 трав. 2016 р. О., 2016. С. 114.
27. Попова Л. Д. Вплив триптофану на вміст нейромедіаторів в головному мозку щурів із різним рівнем судомної готовності // Мед. хімія. 2007. № 1. С. 82-85.
28. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований. Изво Ленинградского ун-та, 1982. 272 с.
29. Сабилов Д.М. Красненкова М.Б. Нейропротекция при травматическом повреждении головного мозга // Shoshilinch tibbiyot axborotnomasi. 2009. 4. С. 50-54.
30. Свістільнік Т.В. Феномен ексайтотоксичності. Механізми виникнення, значення в розвитку нейронального пошкодження та можливості його корекції при патологіях ЦНС // Biomedical and biosocial anthropology. 2013. 20. С. 207-215.
31. Ходаківський О. А., Ходаківська О. В., Петрик І. О., Погоріла А. В., Повх В. Л., Комнацька К. М. Можливість використання нейро- та кардіомаркерів для фармакологічного скринінгу органопротекторів // Тези доп. V Нац. з'їзд фармакологів України : м. Запоріжжя, 18–20 жовтн. 2017 р. З., 2017. С. 133–134.

32. Ходаківський О. А., Черешнюк І. Л., Ходаківська О. В., Комнацька К. М., Петрик І. О., Повх В. Л., Погоріла А. В., Жабоедова Н. В., Мельник А. В., Прокопенко С. В., Заїчко Н. В., Шінкарук-Диковицька М. М., Редькін Р. Г. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) // Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: матеріали ІХ Всеукр. наук.-практ. конфер. з міжнар. участю, м. Вінниця, 16–17 листоп. 2017 р. В. 2017. С. 269–273.
33. Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Загорій Г. В., Ходаковський А. А. Цереброваскулярные эффекты блокаторов NMDA-рецепторов и мексидола на фоне аллоксанового сахарного диабета, а также их влияние на течение метаболических процессов в сетчатке монгольских песчанок в острый постперфузионный период // Врач-аспирант. 2016. 74(1.2). С. 295-303.
34. Черешнюк І. Л., Комнацька К. М., Повх В. Л., Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109789 Україна МПК А61F 9/00 Спосіб моделювання контузії ока для скринінгової оцінки нейроретинопротективної активності лікарських засобів та біологічно активних речовин. № у 201601524; заявл. 19.02.16; опубл. 12.09.16, Бюл. № 17, 2016 р.
35. Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Використання нейромаркерів (білок S 100) та методу протокової цитометрії для порівняльної оцінки впливу блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока // Світ медицини та біології. 2016. 2(56). С. 159-164.
36. Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Комнацька К. М., Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109424 Україна МПК А61К 31/00 А61Р 27/02 Застосування цитопротекторів, вибраних з ряду цитиколіну, мелатоніну, мексидолу, корвітину, тіотриазоліну та розчину сульфату магнію, як

нейроретинопротекторів. № и 201601703 ; заявл. 23.02.16; опубл. 25.08.16, Бюл. № 16, 2016 р.

37. Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Ходаківський О. А., Загорій Г. В. Оцінка ефективності експериментальної терапії контузії зорового аналізатора промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлориду („Адемол”) або амантадином сульфатом („ПК-МЕРЦ”) за маркером нейропроліферативних процесів – рівнем білка S-100 // VIII Нац. з’їзд фармацевтів України : тези доп., м. Харків, 13–16 верес. 2016 р. Х., 2016. С. 125–126.
38. Черешнюк І.Л. Лікувально-профілактична ефективність вінборону при експериментальній ішемії сітківки та зорового нерва: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.05 / Вінниц. нац. мед. ун-т ім. М. І. Пирогова. Вінниця, 2010. - 147 с.
39. Черний В.И., Андропова И.А., Городник Г.А., Назаренко К.В., Черний Т.В. Антагонист глутаматных NMDA-рецепторов (амантадина сульфат) в интенсивной терапии тяжелой черепно-мозговой травмы // Медицина неотложных состояний. 2015. 5(68). С. 81-91.
40. Abdel-Hamid A.A., Firgany Ael-D., Ali E.M. Effect of memantine: A NMDA receptor blocker, on ethambutol-induced retinal injury // Ann Anat. 2016: doi: 10.1016/j.aanat.2015.11.006.
41. Arıkan S., Ersan I., Karaca T., Kara S., Gencer B., et al. Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model // Arq Bras Oftalmol. 2015. 78(2). P. 100-104.
42. Arslan F., Smeets M.B., O’Neill L.A., Keogh B., McGuirk P., Timmers L., et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody // Circulation. 2010. 121(1). P. 80–90.
43. Arumugam T.V., Okun E., Tang S-C., Thundyil J., Taylor S.M., Woodruff T.M. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury // Shock. 2009. 32(1). P. 4–16.

44. Asomugha C.O., Linn D.M., Linn C.L. ACh receptors link two signaling pathways to neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in isolated RGCs // *J Neurochem* 2010. 112. P. 214–226.
45. Ali M.M., Bagratuni T., Davenport E.L., Nowak P.R., Silva-Santisteban M.C., et al. Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response // *EMBO J.* 2011. 30(5). P. 894–905.
46. Bae H.W., Lee N., Seong G.J., Rho S., Hong S., et al. Protective effect of etanercept, an inhibitor of tumor necrosis factor- α , in a rat model of retinal ischemia // *BMC Ophthalmol.* 2016. doi: 10.1186/s12886-016-0262-9.
47. Balazy M., Chemtob S. Trans-arachidonic acids: new mediators of nitro-oxidative stress // *Pharmacology & Therapeutics.* 2008. 119(3). P. 275–290.
48. Beauchamp M.H., Sennlaub F., Speranza G. et al. Redoxdependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy // *Free Radical Biology & Medicine.* 2004. 37(11). P. 1885–1894.
49. Bedard K., Krause K-H. The Nox family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // *Physiol Rev.* 2007. 87. P. 245–313.
50. Belforte N., Moreno M., de Zavalía N. et al. Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma // *J.Pineal.Res.* 2010 Vol. 48. № 4. P. 353–364.
51. Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage // *Current Pharmaceutical Design.* 2004. 10(14). P. 1611–1626..
52. Berger S., Savitz S.I., Nijhawan S., Singh M., David J., Rosenbaum P.S., et al. Deleterious role of TNF- α in retinal ischemia-reperfusion injury // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008. 49(8). P. 3605–3610.
53. Berk B.-A., Vogler S., Pannicke T., et al. Brain-derived neurotrophic factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by activation of basic fibroblast growth factor signaling // *Neuroscience.* 2015. 295. P. 175–186.

54. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004. 430(6996). P. 257–263.
55. Beynon S.B., Walker F.R. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology // *Neuroscience*. 2012. 225. P. 162–171.
56. Bian H., Bian W., Lin X., Ma Z., Chen W., Pu Y. RNA Interference Silencing of Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibites Tau Phosphorylation in Mice with Alzheimer Disease // *Neurochem. Res*. 2016. 41. P. 2470–2480.
57. Bratane B.T., Cui H., Cook D.J., Bouley J., Tymianski M. Fisher M. Neuroprotection by freezing ischemic penumbra evolution without cerebral blood flow augmentation with a postsynaptic density-95 protein inhibitor. *Stroke*. 2011;42(11). 3265-3270.
58. Brault S., Gobeil Jr.F., Fortier A. et al. Lysophosphatidic acid induces endothelial cell death by modulating the redox environment // *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007. 292. P. 1174–1183.
59. Breitling J, Aebi M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. 5(8). doi: 10.1101/cshperspect.a013359
60. Brennan A.M., Won Suh S., Joon Won S., [et al]. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation // *Nat Neurosci*. 2009. 12. P. 857–863.
61. Brown M.K., Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases // *Front. Physiol*. 2012. 3. P. 263.
62. Calzada J.I., Jones B.E., Netland P.A., Johnson D.A. Glutamate-induced excitotoxicity in retina: neuroprotection with receptor antagonist, dextromethorphan, but not with calcium channel blockers // *Neurochem Res*. 2002. 27(1-2). P. 79-88.

63. Chakraborty S., Kaushik D.K., Gupta M., Basu A. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology // *J Neurosci Res*. 2010. 88(8). P. 1615–1631.
64. Chen G.Y., Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage // *Nat Rev Immunol*. 2010. 10(12). P. 826–837.
65. Chew E.Y., Ambrosius W.T., et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes // *New England Journal of Medicine*. 2010. 363(3). P. 233–244.
66. Chew E.Y., Clemons T., SanGiovanni J.P., Danis R., Domalpally A., et al. The age-related eye disease study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1) // *Ophthalmology*. 2012. 119(11). P. 2282–2289.
67. Chi W., Li F., Chen H., Wang Y., Zhu Y., Yang X., et al. Caspase-8 promotes NLRP1/NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in acute glaucoma // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. 111(30). P. 11181–11186.
68. Chiha W., LeVaillant C.J., Bartlett C.A., Hewitt A.W., Melton P.E., et al. Retinal genes are differentially expressed in areas of primary versus secondary degeneration following partial optic nerve injury // *PLoS One*. 2018. 13(2). doi: 10.1371/journal.pone.0192348. eCollection 2018.
69. Cho K.J., Kim J.H., Park H.Y., Park C.K. Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion // *Brain Res*. 2011. 1403. P. 67-77.
70. Chong A.J., Shimamoto A., Hampton C.R., Takayama H., Spring D.J., Rothnie C.L., et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004. 128(2). P. 170–179.
71. Coleman C.G., Wang G., Faraco G., Marques Lopes J., Waters E.M., et al. Membrane trafficking of NADPH oxidase p47(phox) in paraventricular hypothalamic neurons parallels local free radical production in angiotensin II slow-pressor hypertension // *J Neurosci*. 2013. 33(10). P. 4308-4316.

72. Cook D.J., Teves L., Tymianski M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain // *Nature*. 2012. 483(7388). P. 213–217.
73. Dantzer R., Walker A.K. Is there a role for glutamate-mediated excitotoxicity in inflammation-induced depression? // *J Neural Transm (Vienna)*. 2014. 121(8). P. 925-932.
74. Dasgupta A., Zheng J., Bizzozero O.A. Protein carbonylation and aggregation precede neuronal apoptosis induced by partial glutathione depletion // *ASN NEURO*. 2012: doi:10.1042/AN20110064.
75. Dasgupta A., Zheng J., Perrone-Bizzozero N.I., Bizzozero O.A. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis // *ASN Neuro*. 2013. 5(1):e00111.
76. Davies C., Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies // *Biochem. Soc. Trans*. 2012. 40. P. 85–89.
77. Delivoria-Papadopoulos M., Marro P.J. Biochemical basis of hypoxic-ischemic encephalopathy // *NeoReviews*. 2010. 11(4). P. 184-192
78. Ding J-D., Johnson L.V., Herrmann R., Farsiu S., Smith S.G., et al. Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related macular degeneration // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. 108(28). P. 279–287.
79. Donnelly N., Gorman A.M., Gupta S., Samali A. The eIF2 α kinases: their structures and functions // *Cell Mol Life Sci*. 2013. 70(19). P. 3493–3511.
80. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiological Reviews*. 2002. 82(1). P. 47–95.
81. Ducharme E., Weinberg J.M. Etanercept // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2008. 8(4). P. 491–502.
82. Duda T., Pertzov A., Sharma R.K. Differential Ca(2+) sensor guanylate cyclase activating protein modes of photoreceptor rod outer segment membrane guanylate cyclase signaling // *Biochemistry*. 2012. 51(23). P. 4650-4657.

83. Dvorianchikova G., Barakat D.J., Hernandez E., Shestopalov V.I., Ivanov D. Toll-like receptor 4 contributes to retinal ischemia/reperfusion injury // *Mol Vis*. 2010. 16. P. 1907–1912.
84. Dvorianchikova G., Pappas S., Luo X., Ribeiro M., Danek D., et al. Virally delivered, constitutively active NF κ B improves survival of injured retinal ganglion cells // *Eur J Neurosci*. 2016. 44(11). P. 2935-2943.
85. Elahy M., Baidur-Hudson S., Cruzat V.F., Newsholme P., Dass C.R. Mechanisms of PEDF-mediated protection against reactive oxygen species damage in diabetic retinopathy and neuropathy // *Journal of Endocrinology*. 2014. 222(3). P. 129–139.
86. Fleischman A., Oron Y., Geyer O. COX-2 inhibition improves retinal function in rats' ischemic eyes // *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014. 30(8). P. 634-641.
87. Fontaine V., Mohand-Said S., Hanoteau N., Fuchs C., Pfizenmaier K., Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2 // *J Neurosci*. 2002. 22(7). P. 1–7.
88. Fort P.E., Losiewicz M.K., Reiter C.E.N., et al. Differential roles of hyperglycemia and hypoinsulinemia in diabetes induced retinal cell death: evidence for retinal insulin resistance // *PLoS ONE*. 2011. 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0026498.
89. Frank-Cannon T.C., Alto L.T., McAlpine F.E., Tansey M.G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? // *Molecular Neurodegeneration*. 2009. 4(17). P. 1750–1326.
90. Fujieda H., Sato T., Wake K. Expression of neuron-specific enolase in the developing rat retina as revealed by immunocytochemistry // *Brain Res Dev Brain Res*. 1994. 82(1-2). P. 69-80.
91. Garcia-Medina J.J., Pinazo-Duran M.D., Garcia-Medina M., Zanon-Moreno V., Pons-Vazquez S. A 5-year followup of antioxidant supplementation in type 2 diabetic retinopathy // *European Journal of Ophthalmology*. 2011. 21(5). P. 637–643.

92. Gardner W., Lowe T.L. Subconjunctivally implantable hydrogels with degradable and thermoresponsive properties for sustained release of insulin to the retina // *Biomaterials*. 2009. 30(33). P. 6541–6547.
93. Gesslein B., Håkansson G., Gustafsson L., Ekström P., Malmsjö M. Tumor necrosis factor and its receptors in the neuroretina and retinal vasculature after ischemia-reperfusion injury in the pig retina // *Mol Vis*. 2010. 16. P. 2317–2327.
94. Giacino J.T., Whyte J., Bagiella E., Kalmar K., Childs N., et al. Placebo-Controlled Trial of Amantadine for Severe Traumatic Brain Injury // *N Engl J Med*. 2012. 366. P. 819–826.
95. Girouard H., Wang G., Gallo E.F., [et al]. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and Nox2 // *J Neurosci*. 2009. 29. P. 2545–2552.
96. Glimcher L.H. XBP1: the last two decades // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010. 69(1). P. 67–71.
97. Golpich M., Amini E., Hemmati F., Ibrahim N.M., Rahmani B., et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) signaling: Implications for Parkinson's disease // *Pharmacol. Res*. 2015. 97. P. 16–26.
98. Gong Y., Chang Z.-P., Renetal R.-T. Protective effects of adeno-associated virus mediated brain-derived neurotrophic factor expression on retinal ganglion cells in diabetic rats // *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2012. 32(3). P. 467–475.
99. Guemez-Gamboa A., Estrada-Sánchez A.M., Montiel T., [et al]. Activation of Nox2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation // *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011. 70. P. 1020–1035.
100. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics // *Nat Med*. 2015. 21(7). P. 677–687.

101. Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β // *Nat Immunol.* 2008. 9(8). P. 857–865.
102. Haque A., Ray S.K., Cox A., Banik N.L. Neuron specific enolase: a promising therapeutic target in acute spinal cord injury // *Metabolic brain disease.* 2016. 31(3). P. 487-495.
103. Hardingham G.E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events // *Biochem Soc Trans.* 2009. 37(6). P. 1147-1160.
104. He C., Sun Y., Ren X., Lin Q., Hu X., Huang X., et al. Angiogenesis mediated by toll-like receptor 4 in ischemic neural tissue // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013. 33(2). P. 330–338.
105. Hernández C., García-Ramírez M., Corraliza L., et al. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes // *Diabetes.* 2013. 62(7). P. 2569–2578.
106. Hernández C., Dal Monte M., Simó R., Casini G. Neuroprotection as a Therapeutic Target for Diabetic Retinopathy // *J Diabetes Res.* 2016. doi: 10.1155/2016/9508541.
107. Hetz C., Martinon F., Rodriguez D., Glimcher L.H. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α // *Physiol Rev.* 2011. 91(4). P. 1219–1243.
108. Honore J.C., Kooli A., Hamel D. et al. Fatty acid receptor Gpr40 mediates neuromicrovascular degeneration induced by transarachidonic acids in rodents // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013. 33(5). P. 954–961.
109. Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer 's disease // *J. Neurochem.* 2008. 104. P. 1433–1439.
110. Hua F., Ma J., Ha T., Xia Y., Kelley J., Williams D.L., et al. Activation of toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion // *J Neuroimmunol.* 2007. 190(1). P. 101–111.

111. Huang T.L., Wen Y.T., Chang C.H., Chang S.W., Lin K.H., et al. Early Methylprednisolone Treatment Can Stabilize the Blood-Optic Nerve Barrier in a Rat Model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy (rAION) // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017. 58(3). P. 1628-1636.
112. Inoue M., Williams K.L., Gunn M.D., Shinohara M.L. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109(26). P. 10480–10485.
113. Ishizuka F., Shimazawa M., Egashira Y., Ogishima H., Nakamura S., et al. Cilostazol prevents retinal ischemic damage partly via inhibition of tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor-kappa B/activator protein-1 signaling pathway // *Pharmacol Res Perspect*. 2013. doi: 10.1002/prp2.6.
114. Issop L., Rone M.B., Papadopoulos V. Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis // *Mol Cell Endocrinol*. 2013. 371(1-2). P. 34–46.
115. Ito Y., Nakamura S., Tanaka H., Tsuruma K., Shimazawa M., Araie M., Hara H. Lomerizine, a Ca²⁺ channel blocker, protects against neuronal degeneration within the visual center of the brain after retinal damage in mice // *CNS Neurosci Ther*. 2010. 16(2). P. 103-114.
116. Ivanov A., Pellegrino C., Rama S., Dumalska I., Salyha Y., Ben-Ari Y., Medina I. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons // *J Physiol*. 2006. 572(3). P. 789–798.
117. Jacobs K.M., Bhave S.R., Ferraro D.J., Jaboin J.J., Hallahan D.E., Thotala D. GSK-3: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways // *Int. J. Cell Biol*. 2012. doi: 10.1155/2012/930710
118. Jariyapongskul A., Rungjaroen T., Kasetsuwan N., Patumraj S., Seki J., et al. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats // *Microvascular Research*. 2007. 74(1). P. 32–38.

119. Jarrett G., Boulton M.E. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration // *Molecular Aspects of Medicine*. 2012. 33(4). P. 399–417.
120. Jia Y.P., Sun L., Yu H.S., Liang L.P., Li W., et al. The Pharmacological Effects of Lutein and Zeaxanthin on Visual Disorders and Cognition Diseases. *Molecules*. 2017. 22(4). doi: 10.3390/molecules22040610.
121. Kajta, M., Beyer C. Cellular strategies of estrogen-mediated neuroprotection during brain development // *Endocrine*. 2003. 1. P. 3–9.
122. Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W. NMDA receptors in clinical neurology excitatory times ahead // *Lancet neurol*. 2008. 7. P. 742-755.
123. Kalogeris T., Bao Y., Korthuis R.J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning // *Redox Biol*. 2014. 2. P. 702-714.
124. Kawaji T., Elner V.M., Yang D.L., Clark A., Petty H.R. Ischemia-induced nitrotyrosine formation and nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human retinal pigment epithelium in vivo // *Redox Rep*. 2011. 16(1). P. 24-26.
125. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways // *Front Immunol*. 2014. 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
126. Kawata K., Liu C.Y., Merkel S.F., Ramirez S.H., Tierney R.T., Langford D. Blood biomarkers for brain injury: What are we measuring? // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016. 68. P. 460-473.
127. Keech A.C., Mitchell P., Summanen P.A., et al. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial // *The Lancet*. 2007. 370(9600). P. 1687–1697.
128. Kermorvant-Duchemin E., Sennlaub F., Sirinyan M. et al. Trans-arachidonic acids generated during oxidative stress induce a thrombospondin-1-dependent microvascular degeneration // *Nature Medicine*. 2005. 11(12). P. 1339–1345.

129. Kijlstra A., Tian Y., Kelly E.R., Berendschot T.T. Lutein: more than just a filter for blue light // *Progress in Retinal and Eye Research*. 2012. 31(4). P.303–315.
130. Kilic U., Kilic E., Matter C.M., Bassetti C.L., Hermann D.M. TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2008. 31(1). P. 33–40.
131. Kim J.H., Lee N.Y., Jung S.W., Park C.K. Expression of N-methyl-d-aspartate receptor 1 in rats with chronic ocular hypertension // *Neuroscience*. 2007. 149(4). P. 908-916.
132. Kolls B.J., Meyer R.L. N-methyl-D-aspartate receptors strongly regulate postsynaptic activity levels during optic nerve regeneration // *J Neurosci Res*. 2013. 91(10). P. 1263-1279.
133. Konstantinova T.S., Bugrova A.E., Shevchenko T.F., Vanin A.F., Kalamkarov G.R. Modification of the nitric oxide concentration regulates the development of the apoptosis in the eye retina // *Biofizika*. 2012. 57(2). P. 325-330.
134. Kowluru R.A., Chan P.S. Oxidative stress and diabetic retinopathy // *Experimental Diabetes Research*. 2007. doi: 10.1155/2007/43603.
135. Kowluru R.A., Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats // *Diabetes*. 2004. 53(12). P. 3233–3238.
136. Kusari J., Zhou S., Padillo E., Clarke K.G., Gil D.W. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2007. 48(11). P. 5152–5159.
137. Lagrèze W.A., Knörle R., Bach M., Feuerstein T.J. Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998. 39(6). P. 1063-1066.
138. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010. 460(2). P. 525-542.

139. Lehnardt S., Lehmann S., Kaul D., Tschimmel K., Hoffmann O., Cho S., et al. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia // *J Neuroimmunol.* 2007. 190(1–2). P. 28–33.
140. Leveille F., El Gaamouch F., Goux E., Lecocq M., Lobner D., Nicole O., Buisson A. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors // *FASEB J.* 2008. 22(12). P. 4258-4271.
141. Li C., Wang L., Huang K., Zheng L. Endoplasmic Reticulum Stress in Retinal Vascular Degeneration: Protective Role of Resveratrol // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2012. 53(6). P. 3241– 3249.
142. Li H-L., Kostulas N., Huang Y-M., Xiao B-G., van der Meide P., Kostulas V., et al. IL-17 and IFN- γ mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat // *J Neuroimmunol.* 2001. 116(1). P. 5–14.
143. Li J., Wang J.J., Yu Q., Wang M., Zhang S.X. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy // *FEBS Lett.* 2009. 583(9). P. 1521–1527.
144. Li W., Yang C., Lu J., Huang P., Barnstable C.J., et al. Tetrandrine protects mouse retinal ganglion cells from ischemic injury // *Drug Des Devel Ther.* 2014. 8. P. 327-339.
145. Lismont C., Nordorem M., Van Veldhoven P.P., Fransen M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes // *Front Cell Dev Biol.* 2015. doi: 10.3389/fcell.2015.00035
146. Liu D., Zhang M., Yin H. Signaling pathways involved in endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis // *Int. J. Neurosci.* 2013. 123. P. 155–162.
147. Liu R., Wang Y., Pu M., Gao J. Effect of alpha lipoic acid on retinal ganglion cell survival in an optic nerve crush model // *Mol Vis.* 2016. 22. P. 1122-1136.

148. Liu X., Ye F., Xiong et al. H. IL-1 β Induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF- κ B signaling pathway // *Experimental Cell Research*. 2015. 331(1). P. 223–231.
149. Liu Y., Leo L.F., McGregor C., Grivitsishvili A., Barnstable C.J., et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2Akita mice // *Molecular Medicine*. 2012. 18. P. 1387–1401.
150. Lorente L. Biomarkers Associated with the Outcome of Traumatic Brain Injury Patients // *Brain Sciences*. 2017: doi:10.3390/brainsci7110142.
151. Lull M.E., Block M.L. Microglial activation and chronic neurodegeneration // *Neurotherapeutics*. 2010. 7(4). P. 354-365.
152. Marro P.J., Delivoria-Papadopoulos M. Neuroprotective treatments for hypoxic-ischemic injury // *Neo Reviews*. 2010. 11. P. 311-315.
153. Martinon F., Gaide O., Pétrilli V., Mayor A., Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity // *Semin Immunopathol*. 2007. 29(3). P. 213–229.
154. Martinon F., Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation // *Cell Death Differ*. 2007. 14(1). P. 10–22.
155. McGee M.A., Abdel-Rahman A.A. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling and Function in Cardiovascular Tissues // *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016. 68(2). 97-105.
156. Miao Y., Dong L.D., Chen J., Hu X.C., Yang X.L., Wang Z. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons // *PLoS One*. 2012. 7(8): doi: 10.1371/journal.pone.0042318.
157. Minhas G., Sharma J., Khan N. Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury // *Front Immunol*. 2016. 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00444
158. Mohan K., Kecova H., Hernandez-Merino E., Kardon R.H., Harper M.M. Retinal ganglion cell damage in an experimental rodent model of blast-

- mediated traumatic brain injury // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013. 54(5). P. 3440-3450. doi: 10.1167/iovs.12-11522.
159. Momeni H.R. Role of Calpain in Apoptosis // *Cell J*. Summer. 2011, 13, 65–72.
160. Mrugacz M., Bryl A., Bossowski A. Neuroretinal Apoptosis as a Vascular Dysfunction in Diabetic Patients // *Current Neuropharmacology*. 2016. 14(8). P. 826-830.
161. Muresanu D.F. Neuroprotection and neuroplastic - the integrated approach and prospects // *Journal of the Neurological Sciences*. 2007. 257. P. 38-43.
162. Mysona B.A., Shanab A.Y., Elshaer S.L., El-Remessy A.B. Nerve growth factor in diabetic retinopathy: beyond neurons // *Expert Review of Ophthalmology*. 2014. 9(2). P. 99–107.
163. Newton P.M., Ron D. Protein kinase C and alcohol addiction. *Pharmacol Res*. 2007. 55(6). P. 570–577.
164. Okamoto S., Pouladi M.A., Talantova M., [et al.] Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nat Med*. 2009. 15(12). P. 1407-1413.
165. Onose G., Daia-Chendreanu C., M. Haras [et al.] Traumatic brain injury: Current endeavours and trends for neuroprotection and related recovery // *Romanian Neurosurgery*. 2011. 18(1). P. 11-30.
166. Otsuka T., Shimazawa M., Inoue Y., Nakano Y., Ojino K., et al. Astaxanthin Protects Against Retinal Damage: Evidence from In Vivo and In Vitro Retinal Ischemia and Reperfusion Models // *Curr Eye Res*. 2016. 41(11). P. 1465-1472.
167. Parodi M.B., Iacono P., Petrucci G., Parravano M., Varano M., et al. Dexamethasone implant for macular edema secondary to ischemic retinal vein occlusions // *Retina*. 2015. 35(7). P. 1387-1392.
168. Pazdro R., Burgess J.R. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010. 131(4). P. 276–286

169. Polato F., Becerra S.P. Pigment epithelium-derived factor, a protective factor for photoreceptors in Vivo // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016. 854. P. 699–706.
170. Polazzi E., Monti B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications // *Progress in Neurobiology*. 2010. 92(3). P. 293–315.
171. Popescu G. K., Murthy S., Borschel W.F. Allosteric Inhibitors of NMDA Receptor Functions // *Pharmaceuticals*. 2010. 3. P. 3240-3257.
172. Povh V. L., Zaichko N. V., Melnyk A.V., Khodakivskiy O. A. Association of neuroretina destruction markers with retinal level of hydrogen sulfide in traumatic injury of the visual analyzer // *Медична та клінічна хімія*. 2018. 20(2). С. 5-11.
173. Qi Y., Zhao M., Bai Y., Huang L., Yu W., Bian Z., et al. Retinal ischemia/reperfusion injury is mediated by toll-like receptor 4 activation of NLRP3 inflammasomes TLR4 regulates NLRP3 activation in retinal IR // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014. 55(9). P. 5466–75.
174. Rammes G., Danysz W., Parsons C.G. Pharmacodynamics of memantine: an update // *Curr Neuropharmacol*. 2008. 6(1). P. 55-78.
175. Rehak M., Drechsler F., Köferl P., Hollborn M., Wiedemann P., et al. Effects of intravitreal triamcinolone acetonide on retinal gene expression in a rat model of central retinal vein occlusion // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011. 249(8). P. 1175-1183.
176. Rivera J.C., Dabouz R., Noueihed B., Omri S., Tahiri H., Chemtob S. Ischemic Retinopathies: Oxidative Stress and Inflammation // *Oxid Med Cell Longev*. 2017. doi: 10.1155/2017/3940241.
177. Roy S., Kern T.S., Song B., Stuebe C. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: implications for targeting diabetic retinopathy // *The American Journal of Pathology*. 2017. 187(1). P. 9–19.
178. Rübsam A., Parikh S., Fort P.E. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy // *Int J Mol Sci*. 2018. 19(4). doi: 10.3390/ijms19040942.

179. Sakai O., Uchida T., Roggia M.F., Imai H., Ueta T., Amano S. Role of Glutathione Peroxidase 4 in Glutamate-Induced Oxytosis in the Retina // Mori K, ed. PLoS ONE. 2015. 10(6): doi:10.1371/journal.pone.0130467.
180. Sakai Y., Tanaka T., Seki M., Okuyama S., Fukuchi T., et al. Cyclooxygenase-2 plays a critical role in retinal ganglion cell death after transient ischemia: real-time monitoring of RGC survival using Thy-1-EGFP transgenic mice // *Neurosci Res.* 2009. 65(4). P. 319-325.
181. Sakamoto K., Kawakami T., Shimada M., Yamaguchi A., Kuwagata M., et al. Histological protection by cilnidipine, a dual L/N-type Ca(2+) channel blocker, against neurotoxicity induced by ischemia-reperfusion in rat retina // *Exp Eye Res.* 2009. 88(5). P. 974-982.
182. Sanchez R.N., Chan C.K., Garg S., Kwong J.M., Wong M.J., Sadun A.A., et al. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003. 44(9). P. 4006–4011.
183. Sano R., Reed J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1833(12). P. 3460–3470.
184. Scarpulla R.C. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 2012. 1819(9-10). P. 1088-1097.
185. Seifert G., Schilling K., Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective // *Nat Rev Neurosci.* 2006. 7(3). P. 194–206.
186. Sen A.P., Gulati A. Use of magnesium in traumatic brain injury // *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 2010. 7. P. 91-99.
187. Sena D.F., Lindsley K. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults // *Cochrane Database Of Systematic Reviews.* 2013. doi: 10.1002/14651858.CD006539. pub3.

188. Seong H., Ryu J., Yoo W.S., Kim S.J., Han Y.S., et al. Resveratrol Ameliorates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury in C57BL/6J Mice via Downregulation of Caspase-3 // *Curr Eye Res.* 2017. 42(12). P. 1650-1658.
189. Shen H., Kreisel D., Goldstein D.R. Processes of sterile inflammation // *J Immunol.* 2013. 191(6). P. 2857–2863.
190. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation // *Cell.* 2010. 140(6). P. 805–820.
191. Tang L.J., Li C., Hu S.Q., [et al]. S-nitrosylation of C-Src via NMDAR-nNOS module promotes C-Src activation and NR2a phosphorylation in cerebral ischemia/reperfusion // *Mol Cell Biochem.* 2012. 365. P. 363-377.
192. Tao W., Dvorianchikova G., Tse B.C., Pappas S., Chou T.H., et al. A Novel Mouse Model of Traumatic Optic Neuropathy Using External Ultrasound Energy to Achieve Focal, Indirect Optic Nerve Injury // *Sci Rep.* 2017. 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-12225-6.
193. Tennyson Andrew G, Lippard Stephen J. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems // *Chem Biol.* 2011. 18. P. 1211–1220.
194. Thelin E.P., Johannesson L., Nelson D., Bellander B.M. S100B is an important outcome predictor in traumatic brain injury // *J Neurotrauma.* 2013. 30(7). P. 519-528.
195. Tim T. Lam; Andrew S. Abler; Jacky M. K. Kwong; Mark O. M. Tso N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)–Induced Apoptosis in Rat Retina // *Investigative Ophthalmology & Visual Science* September. 1999. 40. P. 2391-2397.
196. Tombran-Tink J. PEDF in angiogenic eye diseases // *Current Molecular Medicine.* 2010. 10(3). P. 267–278.
197. Trendelenburg G. Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways // *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014. 34(12). P. 1857–1867.
198. Tymianski M. Can molecular and cellular neuroprotection be translated into therapies for patients?: yes, but not the way we tried it before // *Stroke.* 2010. 41(10 Suppl). S. 87–90.

199. Tymianski M. Novel approaches to neuroprotection trials in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2013. 44(10). P. 2942–2950.
200. Uemura A., Mizota A. Retinal concentration and protective effect against retinal ischemia of nilvadipine in rats // *Eur J Ophthalmol*. 2008. 18(1). P. 87-93.
201. Ueta T., Inoue T., Furukawa T., Tamaki Y., Nakagawa Y., Imai H., Yanagi Y. Glutathione Peroxidase 4 Is Required for Maturation of Photoreceptor Cells // *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. 287(10). P. 7675–7682.
202. Ullian E.M., Barkis W.B., Chen S., Diamond J.S., Barres B.A. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity // *Mol Cell Neurosci*. 2004. 26(4). C. 544-557.
203. Vasudevan S.K. Gupta V., Crowston J.G. Neuroprotection in glaucoma // *Indian J. Ophthalmol*. 2011. 59. P. 102-113.
204. Wang D.B., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R.S. p53 and Mitochondrial Function in Neurons // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. 1842. P. 1186–1197.
205. Wang H., Wang L., Li N.L., [et al]. Subanesthetic isoflurane reduces zymosan-induced inflammation in murine Kupffer cells by inhibiting ROS-activated p38 MAPK/NF- κ B signaling // *Oxid Med Cell Longev*. 2014. doi: 10.1155/2014/851692
206. Wang Y., Lu Q., Gao S., et al. Pigment epithelium-derived factor regulates glutamine synthetase and l-glutamate/l-aspartate transporter in retinas with oxygen-induced retinopathy // *Current Eye Research*. 2015. 40(12). P. 1232–1244.
207. Watcharasit P., Bijur G.N., Song L., Zhu J., Chen X., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) binds to and promotes the actions of p53 // *J. Biol. Chem*. 2003. 278. P. 48872–48879.
208. Wen X.H., Duda T., Pertzev A., Venkataraman V., Makino C.L., Sharma R.K. S100B serves as a Ca(2+) sensor for ROS-GC1 guanylate cyclase in cones

- but not in rods of the murine retina // *Cell Physiol Biochem*. 2012. 29(3-4). P. 417-430.
209. Wingler K., Hermans J.J.R., [et al]. Nox1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress // *Br J Pharmacol*. 2011. 164. P. 866–883.
210. Winterhalter S., Vom Brocke G.A., Pilger D., Eckert A., Schlomberg J., et al. Retrospective, controlled observational case study of patients with central retinal vein occlusion and initially low visual acuity treated with an intravitreal dexamethasone implant // *BMC Ophthalmol*. 2016. 16(1). P. 187.
211. Wnuk A., Kajta M. Steroid and Xenobiotic Receptor Signalling in Apoptosis and Autophagy of the Nervous System // *Int J Mol Sci*. 2017. 18(11). doi: 10.3390/ijms18112394.
212. WoldeMussie E., Yoles E., Schwartz M., Ruiz G., Wheeler L.A. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats // *J Glaucoma*. 2002. 11(6). P. 474-480.
213. Wong T.Y., Simo R., Mitchell P. Fenofibrate - a potential systemic treatment for diabetic retinopathy? // *American Journal of Ophthalmology*. 2012. 154. P. 6–12.
214. Wu J., Rutkowski D.T., Dubois M., Swathirajan J., Saunders T., et al. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress // *Dev Cell*. 2007. 13(3). P. 351–364.
215. Wu Q., Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection // *Mol Brain*. 2018. 11(1). doi: 10.1186/s13041-018-0357-8.
216. Yamamoto K., Sato T., Matsui T., Sato M., Okada T., et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1 // *Dev Cell*. 2007. 13(3). P. 365–376.
217. Yiğit U., Erdenöz S., Uslu U., Oba E., Cumbul A., et al. An immunohistochemical analysis of the neuroprotective effects of memantine, hyperbaric oxygen therapy, and brimonidine after acute ischemia reperfusion injury // *Mol Vis*. 2011. 17. P. 1024-1033.

218. Yong Liu, David C. Buck and Kim A. Neve. Novel Interaction of the Dopamine D2 Receptor and the Ca²⁺ Binding Protein S100B: Role in D2 Receptor Function // *Molecular Pharmacology*. 2008. 74 (2). P. 371-378.
219. Yoshida S., Yoshida A., Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF- α in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004. 42(5). P. 409–413.
220. Yu Y., Chen H., Su S.B. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy // *Journal of Neuroinflammation*. 2015. 12(141). doi: 10.1186/s12974-015-0368-7
221. Zeng L., Tallaksen-Greene S.J., Wang B., Albin R.L., Paulson H.L. The de-ubiquitinating enzyme ataxin-3 does not modulate disease progression in a knock-in mouse model of Huntington disease // *J Huntingtons Dis*. 2013. 2(1). P. 201–215.
222. Zhang S.X., Ma J.H., Bhatta M., Fliesler S.J., Wang J.J. The unfolded protein response in retinal vascular diseases: implications and therapeutic potential beyond protein folding // *Prog Retin Eye Res*. 2015. 45. P. 111-131.
223. Zhao S., Li J., Wang N., et al. Fenofibrate suppresses cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy via a sirtuin 1-dependent signalling pathway // *Molecular Medicine Reports*. 2015. 12(4). P. 6112–6118.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Комнацька К. М., Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Комплексний підхід до доклінічної оцінки безпеки нейроретинопротекторів при різних шляхах введення // Вісник морфології. 2015. 21(2). С. 379-385. (Особистий внесок - визначення фонових рівнів нейромаркерів в сироватці крові методом ІФА, участь у дослідженні показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, участь в обробці та аналізі результатів щодо груп інтактних та псевдооперованих тварин, участь у формулюванні висновків та підготовці статті до друку).
2. **Повх В. Л.** Нейроретинопротекторні властивості модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні ока (експериментальне дослідження) // Вісник морфології. 2016. 22(1). С. 53-57.
3. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Використання нейромаркерів (білок S 100) та методу протокової цитометрії для порівняльної оцінки впливу блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока // Світ медицини та біології. 2016. 2(56). С. 159-164. (Особистий внесок – участь в моделюванні ішемії/реперфузії ока у щурів, дослідження впливу блокаторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові методом ІФА, дослідження цитометричних маркерів в сітківці ока щурів, статистична обробка матеріалу, оформлення статті).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

4. Черешнюк И. Л., **Повх В. Л.**, Загорий Г. В., Ходаковский А. А. Цереброваскулярные эффекты блокаторов NMDA-рецепторов и мексидола на фоне аллоксанового сахарного диабета, а также их влияние на течение метаболических процессов в сетчатке монгольских песчанок в острый постперфузионный период // Врач-аспирант. 2016. 74(1.2). С. 295-303. (Особистий внесок – проведення частини досліджень щодо показників метаболічного стану сітківки ока тварин, статистична обробка отриманих результатів та написання частини статті).
5. **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А., Ходаківський М. А. Порівняльна оцінка величини антиапоптотичного ефекту серед модуляторів активності NMDA-рецепторів в умовах модельної перехідної ішемії реперфузії ока за даними протоково-цитометричного аналізу // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2016. 4. С. 84-87. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, підготовка та моделювання ішемії /реперфузії ока у тварин, проведення цитометричних досліджень в суспензії клітин сітківки, аналіз та статистичній обробка отриманих даних, участь в обговоренні результатів та формулюванні висновків, оформлення статті).
6. **Повх В. Л.**, Фоміна Л. В., Ходаківський М. А., Ходаківський О. А. Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюса ока після контузії або в гострий постреперфузійний період на тлі реканалізації а. ophthalmica // Буковинський медичний вісник. 2017. 1(81). С. 106-111. (Особистий внесок - відтворення модельної патології, доплерографічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка та переклад резюме, оформлення і подача до друку статті).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

7. Повх В. Л. Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні зміни в сітківці при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(1). С. 136-141.
8. Povh V. L., Zaichko N. V., Melnyk A.V., Khodakivskiy O. A. Association of neuroretina destruction markers with retinal level of hydrogen sulfide in traumatic injury of the visual analyzer // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(2). С. 5-11 (Особистий внесок - визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові спектрофотометричним методом, участь у дослідженні показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, рівня глутамату в сітківці ока хроматографічним методом, обробка та аналіз результатів).
9. Черешнюк І. Л., Комнацька К. М., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109789 Україна МПК А61F 9/00 Спосіб моделювання контузії ока для скринінгової оцінки нейроретинопротективної активності лікарських засобів та біологічно активних речовин. № у 201601524; заявл. 19.02.16; опубл. 12.09.16, Бюл. № 17, 2016 р. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, участь у розробці та відтворенні модельної патології, участь у проведенні скринінгових досліджень, статистична обробка отриманих даних).
10. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Комнацька К. М., Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109424 Україна МПК А61К 31/00 А61Р 27/02 Застосування цитопротекторів, вибраних з ряду цитиколіну, мелатоніну, мексидолу, корвітину, тіотриазоліну та розчину сульфату магнію, як нейроретинопротекторів. № у 201601703; заявл. 23.02.16; опубл. 25.08.16, Бюл. № 16, 2016 р. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення досліджень у серії визначення нейроретинопротекторної активності магнію сульфату: моделювання патології, проведення лікування, забір матеріалу, виконання біохімічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування висновку).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

11. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А., Загорій Г. В. Оцінка ефективності експериментальної терапії контузії зорового аналізатора промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлориду („Адемол”) або амантадином сульфатом („ПК-МЕРЦ”) за маркером нейропроліферативних процесів – рівнем білка S-100 // VIII Нац. з'їзд фармацевтів України : тези доп., м. Харків, 13–16 верес. 2016 р. X., 2016. С. 125–126. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез).
12. **Повх В. Л.** Морфо-функціональна оцінка офтальмопротекторних ефектів мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при експериментальній перехідній ішемії ока // V Міжнар. науково-практична конференція молодих вчених : тези доп., м. Вінниця, 15–16 трав. 2014 р. В., 2014. С. 142-145.
13. **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка нейроретинопротекторної дії мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при контузійній травмі ока у кролів за активністю нейрон-специфічної енолази // Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, пам'яті професора В. В. Дунаєва : матеріали конф., м. Запоріжжя, 24-25 листоп. 2016 р. З., 2016. – С. 63-64. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, виконання запланованих досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез до друку).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

14. **Повх В. Л.**, Черешнюк І. Л., Ходаківський О. А., Попова О. І. Перспективи сучасної нейроретинопротекції – фокус на модулятори розвитку глутаматної ексайтотоксичності // Науково-практична конференція з міжнародною участю „Філатовські читання – 2016”, присвячена 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я : матеріали конф., м. Одеса, 19-20 трав. 2016 р. О., 2016. С. 114. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення експериментів, статистична обробка даних, підготовка, оформлення та подача тез).
15. Ходаківський О. А., Ходаківська О. В., Петрик І. О., Погоріла А. В., **Повх В. Л.**, Комнацька К. М. Можливість використання нейро- та кардіомаркерів для фармакологічного скринінгу органопротекторів // Тези доп. V Нац. з'їзд фармакологів України : м. Запоріжжя, 18–20 жовтн. 2017 р. З., 2017. С. 133–134. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення експериментів, статистична обробка отриманих даних, підготовка, оформлення та подача тез).
16. Ходаківський О. А., Черешнюк І. Л., Ходаківська О. В., Комнацька К. М., Петрик І. О., **Повх В. Л.**, Погоріла А. В., Жабоедова Н. В., Мельник А. В., Прокопенко С. В., Заїчко Н. В., Шінкарук-Диковицька М. М., Редькін Р. Г. Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки, тощо) // Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: матеріали ІХ Всеукр. наук.-практ. конфер. з міжнар. участю, м. Вінниця, 16–17 листоп. 2017 р. В. 2017. С. 269–273. (Особистий внесок дисертанта: здійснював вивчення нейроретинопротекторної активності препаратів при травмі ока).

ДОДАТОК Б

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. V Науковій конференції молодих вчених з міжнародною участю (Вінниця, 2014, форма участі - публікація тез);
2. VIII Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва (Запоріжжя, 2016, форма участі - публікація тез);
3. Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Філатовські читання – 2016”, присвяченої 80-річчю з дня заснування Інституту очних хвороб і тканинної терапії імені В.П. Філатова Національної академії медичних наук України та XIV конгресу офтальмологічного товариства країн Причорномор'я (Одеса, 2016, форма участі – постерна доповідь);
4. V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017, форма участі - публікація тез);
5. IX Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України» (Вінниця, 2017, форма участі - публікація тез).