

which allows to recommend Morita Veraviewepocs 3D for reliable metric studies of bone structures in vivo.

Key words: morphometry, skull, computer tomography.

Рецензент: д.мед.н., проф. Гунас І.В.

Стаття надійшла до редакції 2.06.2015 р.

Дмитриев Николай Александрович - к.мед.н., доц., доцент кафедри стоматології дитячого віку ВНМУ ім. Н.І. Пирогова; +38 063 628-31-78

Марченко Алла Владимировна - к.мед.н., доц., доцент кафедри терапевтичної стоматології ВГУ України "Українська медичинська стоматологічна академія"; +38 097 071-91-14

Филимонов Валерий Юрьевич - асистент кафедри стоматології дитячого віку ВНМУ ім.Н.І.Пирогова; +38 063 628-31-78

Ясько Владимир Васильевич - к.мед.н., асистент кафедри лучової діагностики, лучової терапії та онкології ВНМУ ім. Н.І. Пирогова; +38 067 782-78-88

© Черешнюк І.Л., Комнацька К.М., Повх В.Л., Ходаківський О.А.

УДК: 615.216.8: 615.032

Черешнюк І.Л.¹, Комнацька К.М.¹, Повх В.Л.², Ходаківський О.А.³

¹Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна); ²ПП "Лікарня Святого Луки" (вул. Велика Перспективна, 65, м. Кіровоград, 25006, Україна); ³Фармацевтична фірма "Дарниця" (вул. Бориспільська, 13, м. Київ, 02093, Україна)

КОМПЛЕКСНИЙ ПІДХІД ДО ДОКЛІНІЧНОЇ ОЦІНКИ БЕЗПЕЧНОСТІ НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКТОРІВ ПРИ РІЗНИХ ШЛЯХАХ ВВЕДЕННЯ

Резюме. У наведеній статті за допомогою комплексного підходу оцінки функціональних показників внутрішньоклітинного метаболізму різних структур ока (сітківка, зоровий нерв та передній епітелій рогівки) доведено можливість токсикологічної оцінки безпечності нейроретинотекторних засобів на прикладі адемолу при різних шляхах його введення. Встановлено фізіологічні норми для активності нейрон-специфічної енолази, показників клітинного циклу за даними протокової цитометрії, маркерів оксидативного та нітрозативного стресу (рівень малонового діальдегіду, карбонільних груп протеїнів, активність глутатіонпероксидази, баланс нітритів і нітратів та вміст аденозинтрифосфорної кислоти, як показника енергетичних процесів), а також їх зміни на тлі застосування нейроцитопротекторного засобу адемолу. Встановлені фізіологічні норми можуть бути використані іншими дослідниками для порівняльної оцінки перебігу метаболічних процесів в клітинах сітківки при різних патологічних станах.

Ключові слова: нейрон-специфічна енолаза, протокова цитометрія, сітківка, зоровий нерв, рогівка, адемола.

Вступ

Згідно сучасних настанов щодо доклінічної оцінки ефективності нових лікарських засобів тієї чи іншої фармакологічної групи є поглиблене вивчення токсикологічних характеристик, зокрема токсичного впливу на різні органи та системи [Стефанов, 2001]. Впровадження у клінічну офтальмологічну практику препаратів із нейроретинотекторною дією у цьому аспекті не є виключенням. Проблематика подібної оцінки полягає у значній коштовності та недосконалому існуючих методів специфічної оцінки впливу нового препарату на функціональний стан зорового аналізатору. Крім того, аналіз доступної нам літератури показав відсутність уніфікованих методів щодо доклінічної оцінки безпечності препаратів які впливають на функції органу зору. Віддаленим наслідком цього є поява та реєстрація тяжких побічних ефектів у препаратів які впродовж тривалого часу присутні на фармацевтичному ринку [Ферфильфайн, Числова, 2001; Белик и др., 2015]. Саме тому комплексна розробка алгоритму критеріїв діагностики основних маркерів, активність або рівень яких віддзеркалює функціональний гомеостаз клітин різних структур ока, є актуальною. Для впровадження цих засад необхідно чітко обґрунтувати вибір маркерів і методів токсикологічної оцінки та встановити їх фізіологічні зна-

чення у тварин.

Мета - встановити фізіологічні норми нейрон-специфічної енолази, вмісту ядерної ДНК клітин сітківки та переднього епітелію рогівки (показники клітинного циклу, фрагментації ДНК, плідності), біохімічних показників оксидативного стресу, енергетичного балансу та обміну монооксиду азоту. Обґрунтувати можливість використання біохімічної та цитометричної діагностики для токсикологічної оцінки впливу цитопротекторів на сітківку, рогівку та зоровий нерв на прикладі модулятора активності NMDA-рецепторів - адемолу.

Матеріали та методи

Експерименти проведено на кролях породи Шиншила масою 3,0-3,9 кг. Усі тварини знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова (ВНМУ) на стандартному водно-жарчовому раціоні при природному освітленні та вільному доступі до води та корму. Тварини перебували в умовах: 12 годин темряви, 12 годин освітлення. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались методичних рекомендацій державного фармацевтичного центру Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України і вимог біоетики згідно до Національних "Загальних етичних

принципів експериментів на тваринах" (2001), що відповідають положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" [Ляпунов і др., 1999; Simone, Serratos, 2005]. Дослідження проводили у науково-дослідній лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І.Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №003/10 від 11 січня 2010 р.) та на базі клініко-діагностичної лабораторії кафедри біохімії (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.).

Досліджували промисловий зразок ампульного розчину адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду ("Адемом", Дарниця, Україна) для внутрішньовенних ін'єкцій (1,0%).

Для з'ясування наявності функціональних змін внутрішньоклітинного метаболізму в сітківці, зоровому нерві та рогівці кролів без офтальмологічної патології на тлі курсового застосування адемола одній групі тварин інго вводили внутрішньом'язево (в/м) дозою 2 мг/кг, а іншій інстилювали у кон'юнктивальний мішок виготовлений *Ex tempore* 0,5% водний розчин адемола з 1,0% розчину через кожні 12 год впродовж 30 діб.

Групою порівняння слугували інтактні тварини без офтальмопатології, яким не вводили жодних фармакологічних препаратів.

Евтаназію тварин виконували в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг внутрішньовенно (в/в) ("FreseniusKabi", Австрія)) [Ходаківський, 2014].

Оцінку процесів нейроретинодеструкції (активність нейрон-специфічної енолази (NSE)) у сироватці крові тварин вимірювали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору NSE ELISA KIT (DAI, США) на приладі фірми "Hirson" (Чехія) [Ходаківський, 2014].

Для проведення цитометричних та біохімічних досліджень сітківки, інтраокулярної частини зорового нерву та переднього епітелію рогівки очі швидко підлягали енуклеації з подальшим промиванням холодним розчином 0,9% NaCl (+4°C - +8°C). Очні яблука кролів позбавляли кон'юнктиви та м'язів і за допомогою мікрохірургічного інструментарію видаляли передній відділ ока з кришталиком. На залишку очного яблука робили 4 надрізи, розправляли для доступного огляду очного дна і видаляли ділянки сітківки [Kaskel et al., 1976; Wang et al., 1993] (рис. 1).

Забір переднього епітелію рогівки (ПЕР) проводили наступним чином: лезом одноразового мікрохірургічного ножа-кератома під контролем бінокулярного мікроскопу МБС-10 отримували зіскрібки усього ПЕР, обмеженого лімбом. З метою зменшення впливу циркадного ритму на показники клітинного циклу клітин ПЕР забір матеріалу здійснювали у ранковий час - з 10:00 до 11:00.

Стан енергетичного та вуглеводного обміну в сітківці оцінювали за вмістом аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ). Вміст АТФ визначали в безбілковому трихло-



Рис. 1. Зовнішній вигляд очного дна під час препарування і забору сітківки для дослідження.

роцтовому екстракті сітківки ока 1:5 (10% розчин трихлороцтової кислоти) хроматографічним методом [Прохорова, 1982]. Вміст загального білка визначали мікροбіуретовим методом з реактивом Бенедикта [Кочетов, 1980]. Інтенсивність оксидативного стресу в сітківці визначали за кінцевим продуктами цього процесу - малоновим діальдегідом (МДА) та показником окисної модифікації білка (ОМБ) - карбонільними групами протеїнів (КГП). Про кількість NO в сітківці судили за рівнем у гомогенатах стабільних метаболітів нітритів та нітратів.

Стан системи антиоксидантного захисту в сітківці оцінювали за активністю глутатіонпероксидази (ГПО). Вміст МДА визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Владимиров, Арчаков, 1972], КГП - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним [Заїчко, 2003]. Сумарний вміст нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині амоніаку [Коренман, 1975]. Активність ГПО визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненого глутатіону [Власова і др., 1990].

Вміст ДНК в ядрах клітин сітківки щурів визначали методом проточної цитометрії. Суспензії ядер з клітин сітківки або ПЕР отримували за допомогою наборів для дослідження ядерної ДНК, відповідно, CyStain DNA Step 1 та CyStain DNA Step 2 (Partec, Німеччина), до складу яких входить діамідинофеніліндол (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконували на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовували ультрафіолетове випромінювання. 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 пе-

ребувають у фазі синтезу ДНК із її вмістом $> 2c$ та $< 4c$ до їх загальної дослідної кількості; G2 + M - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G2 + M клітинного циклу із вмістом ДНК = 4с до їх загальної дослідної кількості; IPr - індекс проліферації, який визначається за сумою показників S + G2 + M; BP - блок проліферації, який оцінюється по співвідношенню S / (G2 + M) (збільшення кількості клітин, які перебувають у фазі G2 + M клітинного циклу при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії G2 + M [Шмаров, Козинец, 2004]. 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 $< 2c$.

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Ст'юдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта - за його відсутності, парний критерій Вілкоксона - для визначення змін у динаміці всередині групи. Аналіз ДНК гістограм виконували засобами програмного забезпечення проточного цитометру FloMax (Partec, Німеччина). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$ та $p < 0,01$.

Результати. Обговорення

Проведене дослідження активності маркера нейродеструктивних процесів - NSE показало, що її фонове значення у венозній крові дорівнює $0,35 \pm 0,021$ нг/мл, що цілком співставляється із показниками активності, які отримували інші дослідники, і вказує на відсутність процесів руйнування мембран нейроцитів [Dunker et al., 2001; Quintyn et al., 2005; Yee et al., 2012].

У зв'язку з тим, що після інстиляції 1,0% розчину адемолу спостерігались виражені гіперемія кон'юнктиви та блефароспазм, у своїх подальших дослідках ми вирішили оцінити вплив закрапування в око даного засобу кролям у більш перспективній терапевтичній концентрації - 0,5% розчину адемолу (при кратності і тривалості застосування двічі на добу впродовж одного місяця).

На 30 добу після курсового в/м введення кролям без офтальмопатології 1,0% розчину адемолу (2 мг/кг) або інстиляції в око 0,5% розчину крапель адемолу достовірного підвищення активності маркера нейродеструкції NSE відносно інтактних тварин не відмічено (табл. 1).

Отримані дані вказують на те, що курсове місцеве (очні краплі) або парантеральне (в/м) введення адемолу не спричиняє та не супроводжується розвитком нейродеструктивних змін в сітківці, і свідчить про відсутність у нього нейроретинотоксичної дії при тривалому застосуванні.

В результаті проточно-цитометричного дослідження суспензій клітин сітківки кролів було встановлено, що фонові показники G0G1, фази синтезу ДНК - S та G2 + M (або ядер з вмістом ДНК = 4с) становили відпо-

Таблиця 1. Аналіз активності нейрон-специфічної енолази в крові кролів без офтальмопатології (фізіологічна норма) на тлі курсового 30-денного внутрішньом'язевого введення адемолу або інстиляції очних крапель (0,5% розчин) ($n=8$, $M \pm m$).

Дослідні групи	Рівень активності NSE (нг/мл)
Інтактні кролі (фізіологічна норма)	$0,35 \pm 0,021$
адемолом очні краплі	$0,34 \pm 0,019$
адемолом, 2 мг/кг в/м	$0,41 \pm 0,020$

Примітка: NSE - нейрон-специфічна енолаза.

Таблиця 2. Аналіз ядерних ДНК-гістограм клітин сітківки кролів без офтальмопатології (фізіологічна норма) на тлі окремого курсового 30-денного внутрішньом'язевого введення адемолу (2 мг/кг) або інстиляції очних крапель (0,5% розчин) ($n=8$, $M \pm \sigma$).

Показник	Інтактні кролі	Адемолом очні краплі	Адемолом
SUB-G0G1, %	$0,95 \pm 0,24$	$0,91 \pm 0,31$	$0,99 \pm 0,25$
G0G1, %	$95,73 \pm 1,13$	$94,29 \pm 1,16$	$94,32 \pm 1,96$
S-фаза, %	$0,17 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02$
G2 + M, %	$4,11 \pm 1,14$	$5,58 \pm 1,16$	$5,55 \pm 1,97$

Примітка: в/м - внутрішньом'язево, SUB-G0G1 - фрагментація ДНК (апоптоз); G0G1 - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G0G1 клітинного циклу із вмістом ДНК = 2с до їх загальної дослідної кількості; S - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі синтезу ДНК із її вмістом $> 2c$ та $< 4c$ до їх загальної дослідної кількості; G2 + M - відсоткове співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с або поліплоїдні). відно в середньому $95,73 \pm 1,13$, $0,17 \pm 0,07$, $4,11 \pm 1,14$ %, а середнє значення інтервалу SUB-G0G1 (фрагментація ДНК) дорівнювало $0,95 \pm 0,24$ % (табл. 2). Отримані дані практично співставляються з результатами раніше проведеного дослідження за аналогічною методикою, щодо визначення вмісту ДНК в клітинах сітківки і в інтактних щурів [Черешнюк, 2015].

При аналізі вмісту ядерної ДНК клітин сітківки кролів на тлі курсового (упродовж 30 діб) щоденного введення адемолу (в/м, 2 мг/кг або при закрапуванні в очі 0,5% розчину), встановлено, що в кінці експерименту при обох способах введення препарату показники ДНК-гістограм клітин сітківки не мали достовірних відмінностей порівняно із аналогічними значеннями визначеними в інтактних тварин (табл. 2; рис. 2 - 4).

Всі значення порівнювали з даними інтактних кролів без офтальмопатології, яким не вводили жодні фармакологічні засоби. Порівняльна оцінка отриманих даних свідчить про відсутність будь-якого небажаного впливу курсового застосування адемолу на ядерну ДНК клітин сітківки кролів (фрагментацію ДНК та проліферативну активність) як при місцевому (очні краплі), так і системному (в/м введення) застосуванні цього лікарського засобу.

Оцінка процесів оксидативного стресу в сітківці за маркерами перекисного окиснення ліпідів - МДА, окисної модифікації білків - КГП та активністю ферменту антиоксидантного захисту показало, що фонове зна-

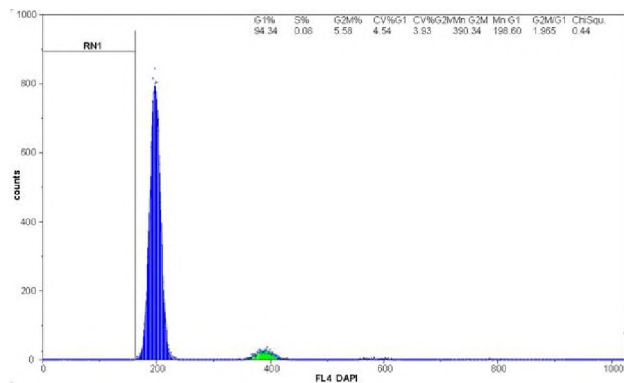


Рис. 2. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин сітківки інтактного кроля. RN1 - фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 0,60 %. Синтез ДНК (S %) = 0,08 %.

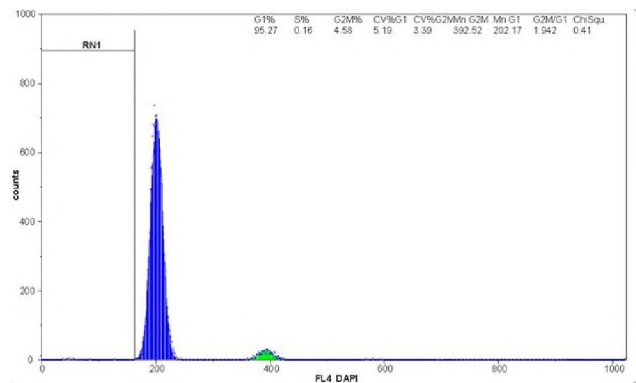


Рис. 3. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин сітківки кроля на тлі 30 денного застосування крапель адемола. RN1 - фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 0,81 %. Синтез ДНК (S %) = 0,16 %.

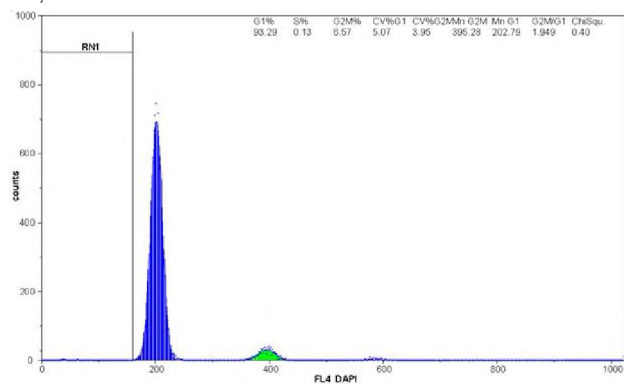


Рис. 4. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин сітківки кроля на тлі 30 денного внутрішньом'язевого застосування адемола. RN1 - фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 0,76 %. Синтез ДНК (S %) = 0,13 %.

тиоксидантної рівноваги (табл. 3). Дослідження енергетичного метаболізму за рівнем макроергів (АТФ), показало, що у інтактних тварин його вміст в сітківці становив $50,40 \pm 1,50$ нмоль/мг протеїну, що вказує на наявність аеробного гліколізу і вказує про достатнє енергозабезпечення сітківки (табл. 3). У інтактних тварин відсутні дані про розвиток нітрозативного стресу та наявний дисбаланс у обміні монооксиду азоту: рівень нітритів та нітратів становив в середньому $5,42 \pm 0,21$ нмоль/мг протеїну (табл. 3).

Щоденне в/м введення адемола впродовж 30 діб, а також його застосування у вигляді очних крапель, не викликає метаболічних змін в сітківці. За цих умов вміст продуктів ліпопероксидації, оксидативного стресу, рівень стабільних метаболітів нітроген монооксиду, АТФ, а також активність ГПО, достовірно не відрізнялись від таких показників інтактних тварин.

Таблиця 3. Перебіг метаболічних процесів у сітківці кролів без офтальмопатології на тлі курсового 30-денного внутрішньом'язевого введення адемола (2 мг/кг) або інстиляції очних крапель (0,5% розчин), $M \pm m$, $n=10$.

Показники	Групи тварин		
	Інтактні кролі	Адемола очні краплі	Адемола
МДА, нмоль / мг протеїну	$3,40 \pm 0,13$	$3,45 \pm 0,19$	$3,32 \pm 0,17$
КГП, нмоль / мг протеїну	$1,10 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,06$	$0,995 \pm 0,051$
ГПО, мкмоль/хв. на 1 мг протеїну	$5,71 \pm 0,19$	$5,65 \pm 0,22$	$5,78 \pm 0,24$
Нітрити та нітрати, нмоль/мг протеїну	$5,42 \pm 0,21$	$5,32 \pm 0,49$	$5,28 \pm 0,47$
АТФ, нмоль/мг протеїну	$50,40 \pm 1,50$	$51,6 \pm 1,63$	$54,1 \pm 1,52$

Примітки: МДА - малоновий діальдегід; КГП - карбонільні групи протеїнів; ГПО - глутатіонпероксидаза; АТФ - аденозинтрифосфорна кислота.

Майже повний цикл зміни клітин переднього епітелію рогівки у кролів відбувається за 14 - 21 добу [Haddad, 2000]. Таким чином, 30-денна інстиляція препарату є достатньою для верифікації можливих порушень у проліферативній активності ПЕР. Оцінюючи розподіл клітин по стадіям клітинного циклу можна зробити висновок стосовно впливу препарату на функціонування рогівки. Будь-які підвищення або зниження проліферативної активності ПЕР, підвищення рівня фрагментації ядерної ДНК клітин епітелію вказують на несприятливий вплив лікарського засобу на морфофункціональний стан рогівки, що віддзеркалюється на можливості його безпечного використання в офтальмологічній практиці.

чення досліджуваних показників у інтактних кролів порівнювало $3,40 \pm 0,13$ і $1,10 \pm 0,04$ нмоль/мг протеїну та $5,71 \pm 0,19$, мкмоль/хв на 1 мг протеїну відповідно, що свідчить про збалансованість процесів оксидантно-ан-

У результаті проведення протокової ДНК-цитометрії суспензій ядер клітин ПЕР, як і в попередніх дослідженнях на сітківці, у всіх випадках були отримані прийнятної якості ДНК-гістограми, що засвідчує коефіцієнт варіації піків G0G1 (табл. 4). Так, за думкою провідних спеціалістів із проточної цитометрії вважається, що значення коефіцієнту варіації (CV) піку G0G1 не мають перевищувати 6-8% [Шмаров, Козинец, 2004; Brothrick, 2005], в іншому випадку стає неможливим

Таблиця 4. Показники ядерних ДНК-гістограм клітин переднього епітелію рогівки кролів на тлі курсового закрапування в око крапель 0,5% розчину адемолу ($n=7$, $M\pm\sigma$).

Показники	Інтактні кролі	Адемола
SUB-G0G1, %	19,09±4,76	19,18±3,98
G0G1, %	90,42±3,48	89,61±3,35
S-фаза, %	5,66±2,32	6,39±2,10
G2 + M, %	3,92±1,30	4,00±1,36
IPr, %	9,58±3,47	10,39±3,35
BP	1,42±0,42	1,62±0,32
CV	5,30±0,90	5,16±0,70

Примітки: SUB-G0G1 - фрагментація ДНК (апоптоз); G0G1 - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G0G1 клітинного циклу із вмістом ДНК = 2с 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; G2 + M - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G2 + M клітинного циклу із вмістом ДНК = 4с до їх загальної дослідної кількості; IPr - індекс проліферації, який визначається за сумою показників S + G2 + M; BP - блок проліферації, який оцінюється по співвідношенню S/(G2 + M); CV - коефіцієнт варіації.

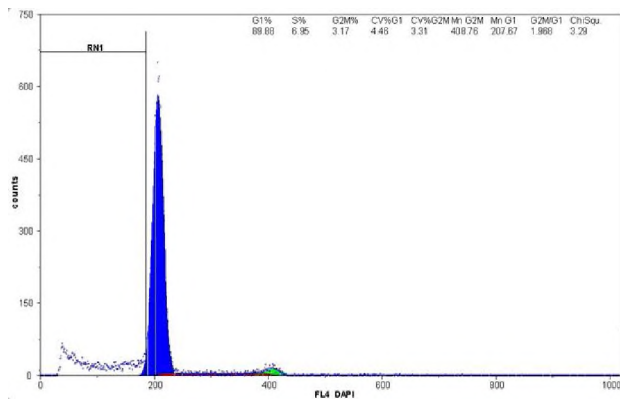


Рис. 5. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин переднього епітелію рогівки інтактного кроля. RN1 - фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 21,05%. Синтез ДНК (S %) = 6,95%.

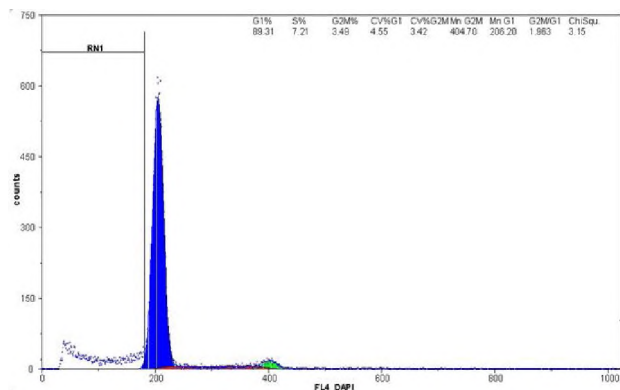


Рис. 6. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин переднього епітелію рогівки кроля, якому упродовж 30 діб закрапували 0,5% розчин адемола. RN1 - фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 19,98%. Синтез ДНК (S %) = 7,21%.

достовірно оцінити показники клітинного циклу, або така оцінка вважається сумнівною. Отже, середнє значення коефіцієнту варіації (CV) піку G0G1 ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин ПЕР інтактних та дослідних кролів становило відповідно $5,30\pm 0,90$ та $5,16\pm 0,70\%$, що дає змогу проводити порівняльну оцінку отриманих показників (чим менше значення CV, тим краще).

На ДНК-гістограмах ядер клітин ПЕР інтактних кролів чітко візуалізувалось два піки, які відповідно вказували на ядра клітин з вмістом ДНК = 2с та 4с. При цьому фоніві показники клітинного циклу ПЕР тварин: G0G1, S-фази та G2 + M становили відповідно в середньому $90,42\pm 3,48\%$, $5,66\pm 2,32\%$, $3,92\pm 1,30\%$, а середнє значення інтервалу SUB-G0G1 (фрагментація ДНК) дорівнювало $19,09\pm 4,76\%$. Середнє значення індексу проліферації становило $9,58\pm 3,47\%$ (табл. 4).

На рис. 5 та 6 представлені приклади типових, оброблених засобами програмного забезпечення FloMax, ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин ПЕР відповідно інтактного кроля та тварини, якій упродовж 30 діб закрапували 0,5% розчин адемола.

Показники аналізу ядерних ДНК-гістограм клітин переднього епітелію рогівки кролів на фоні застосування крапель 0,5% водного розчину адемола представлено в табл. 4.

Достовірної різниці між усіма, без виключення, показниками ДНК-гістограм (фази G0G1, фази синтезу ДНК, фази G2 + M, індексами проліферації та блоку проліферації) отриманих з ядерних суспензій клітин ПЕР очей інтактних кролів та тварин, яким упродовж 30 діб закрапували 0,5% розчин адемола встановлено не було. Також не було встановлено достовірної різниці і між середніми значеннями показників інтервалу SUB-G0G1 (рівень фрагментації ДНК) клітин ПЕР очей інтактних кролів та тварин, яким упродовж 30 діб закрапували 0,5% розчин адемола, що свідчить про відсутність апоптотичного пошкодження клітин ПЕР при тривалому місцевому застосуванні даного препарату у вказаній концентрації. Все це свідчить, що застосування 0,5% адемола у вигляді очних інстиляцій не впливає на клітинний цикл ПЕР і, відповідно, не порушує нормальні процеси проліферації та апоптозу у цій структурі.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлені фізіологічні рівні та межі активності біохімічних та ДНК-цитометричних маркерів клітинного гомеостазу сітківки, зорового нерву та переднього епітелію рогівки кролів. Так, активність NSE складала $0,35\pm 0,021$ нг/мл; рівень малонового діальдегіду, карбонільних груп протеїнів, аденозинтрифосфорної кислоти, нітритів і нітратів, а також активність глутатіонпероксидази в сітківці відповідно $3,40\pm 0,13$; $1,10\pm 0,04$; $50,40\pm 1,50$; $5,42\pm 0,21$ нмоль/мг протеїну та

5,71±0,19 мкмоль/хв. на 1 мг протеїну. При цьому, відсоткове співвідношення ядер у різних періодах клітинного циклу сітківки складає: у фазах G0G1, S, G2 + M, SUB-G0G1 (фрагментація ДНК) відповідно 95,73±1,13; 0,17±0,07; 4,11±1,14 та 0,95±0,24%. Аналогічно до перерахованих показників, відсоткове співвідношення ядер клітин переднього епітелію рогівки у цих фазах наступний - 90,42±3,48; 5,66±2,32; 3,92±1,30 та 19,09±4,76% при IPr 9,58±3,47%.

2. Дослідження впливу курсового щоденного внутрішньом'язевого введення кролям без офтальмопатології 1,0% розчину адемола (2 мг/кг) або інстиляції в очі його 0,5% розчину показало відсутність негативної дії подібної терапії на вміст ДНК (клітинний цикл, фрагментація ДНК, плоідність) та біохімічний гомеостаз клітин сітківки, зорового нерву та переднього епітелію рогівки за критеріями активності нейромаркерів, цитометричного аналізу та перебігу метаболіч-

них процесів (енергетичний обмін та оксидантно-антиоксидантний баланс).

Запропоновані методи токсикологічної оцінки функціонального стану метаболізму сітківки, зорового нерву та епітелію рогівки з урахуванням визначених фізіологічних рівнів та меж активності запропонованих маркерів можна рекомендувати як для доклінічної оцінки нейроретинопротекторної активності нових біологічних речовин, так і для встановлення їх можливого токсичного впливу на орган зору.

Подяка. Автори статті висловлюють щирі подяки Загорію Глібу Володимировичу, доктору фармацевтичних наук, доценту кафедри організації та економіки фармації НМАПО ім. П.Л. Шупика та колективу фармацевтичної фірми "Дарниця" (завод розробник промислового зразка ампульної форми розчину "Адемола") за матеріально-технічне сприяння при виконанні окремих фрагментів досліджень.

Список літератури

- Владимиров Ю.В. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах /Ю.В.Владимиров, А.И.Арчаков.- М.: Наука, 1972.- 252с.
- Власова С.Н. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей /С.Н.Власова, Е.И.Шабунина, И.А.Персегина //Лаб. дело.- 1990.- №8.- С.19-22.
- Заїчко Н.В. Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом /Н.В.Заїчко //Вісник Вінницького держ. мед. унів.- 2003.- №7 (2/2).- С.664-666.
- Коренман И.М. Методы определения органических соединений.- М.:Химия, 1975.- 360с.
- Кочетов Г.А. Практик. рук-во по энзимологии.- М.: Высшая школа, 1980.- 272с.
- Лекарственная токсикология: учебник-справочник / [Белик Г.В., Бутко Я.А., Бухтиярова Т.А. и др.]; под ред. С.М.Дрогозов, В.Д.Лукьянчук, Б.С.Штейман.- Харьков: Титул, 2015.- 592с.
- Надлежащая производственная практика лекарственных средств /ред.Н.-А.Ляпунов.- К.: МОРИОН, 1999.- С.508-545.
- Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований /
- М.И.Прохорова. Л.: Из-во Ленинградского ун-та, 1982. - 272 с.
- Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. реком. / за ред. О.В.Стефанова.- К.: Авіценна, 2001.- 528с.
- Ферфильфайн И.Л. Глаз и побочное действие лекарств /И.Л.Ферфильфайн, Т. Д. Числова.- Д.: Пороги, 2001.- 175с.
- Ходаківський О.А. Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда: автореф. дис. ... д. мед. н. / О.А.Ходаківський.- Одеса., 2014.- 32с.
- Черешнюк І. Л. Застосування проточної цитометрії для скринінгової оцінки вмісту ДНК в ядрах клітин нейрональної сітківки в щурів /І.Л.Черешнюк //Вісник морфології.- 2015.- Т.21, №1.- С.222-226.
- Шмаров Д.А. Лабораторно-клиническое значение проточно-цитометрического анализа крови /Д.А.Шмаров, Г.И.Козинец.- М.: Мед. информативство, 2004.- 128с.
- A method for the isolation of retinal pigment epithelial cells from adult rats /N.Wang, C.A.Koutz, R.E.Anderson //Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 1993.- Vol.34(1).- P.101-107.
- Brotherick I. Basic DNA Measurement by Flow Cytometry /Ian Brotherick //
- Guide_to_flow_cytometry.- 2005.- Ch.16.- P.99-106.
- Concentration of neuron-specific enolase and S100 protein in the subretinal fluid of rhegmatogenous retinal detachment /J.C.Quintyn, F.Pereira, M. F.Hellot [et al.] //Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.- 2005.- Vol.243(11).- P.1167-1174.
- Dunker S. Neuron specific enolase in retinal detachment /S.Dunker, A.A.Sadun, J.Sebag //Curr. Eye Res.- 2001.- Vol.23(5).- P.382-385.
- Enzymologic and histologic investigations in normal and pressure-Ischemic retina of rabbits /D.Kaskel, H.Valenzuela, O.Hockwin [et al.] // Schedtler Graefes Archiv und experimentelle ophthalmologie.- 1976.- Vol.200.- P.71-78.
- Haddad A. Renewal of the rabbit corneal epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of 3H-thymidine /A.Haddad //Cornea.- 2000.- Vol.19(3).- P.378-383.
- Simone F. Biotechnology, animal health and animal welfare within the framework of European Union legislation / F.Simone; J.Serratos //Rev. Sci. Tech. Oie.- 2005.- Vol.24, №1.- P.89-99.
- Yee K.M. Neuron-specific enolase is elevated in asymptomatic carriers of Leber's hereditary optic neuropathy /K.M.Yee, F.N.Ross-Cisneros, J.G.Lee [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.- 2012.- Vol.21;53(10).- P.6389-6392.

Черешнюк І.Л., Комнацкая Е.Н., Повх В.Л., Ходаковський А.А. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ НЕЙРОРЕТИНОПРОТЕКТОРОВ ПРИ РАЗНЫХ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ

Резюме. В данной статье при помощи комплексного подхода оценки функциональных показателей внутриклеточного метаболизма различных структур глаза (сетчатка, зрительный нерв и передний эпителий роговицы) доказана возможность токсикологической оценки безопасности нейроретинопротекторных средств на примере Адемола при разных путях его введения. Установлено физиологические нормы для активности нейрон-специфической энлазы, показателей клеточного цикла по данным проточной цитометрии, маркеров оксидативного и нитрозативного стресса (уровень малонового

диальдегида, карбонильных групп протеинов, активность глутатионпероксидазы, баланс нитритов и нитратов, содержание аденозинтрифосфорной кислоты, как показателя энергетических процессов), а также их изменения на фоне применения нейроцитопротекторного средства Адемола. Установлены физиологические нормы могут быть использованы другими исследователями для сравнительной оценки метаболических процессов в клетках сетчатки при разных патологических состояниях.

Ключевые слова: нейрон-специфическая энлаза, проточная цитометрия, сетчатка, зрительный нерв, роговица, адемола.

Chereshnyuk I.L., Komnatska K.M., Povkh V.L., Khodakivskiy O.A.

A COMPREHENSIVE APPROACH TO CLINICAL SAFETY ASSESSMENT OF NEURORETINOPROTECTORS ADMINISTERED IN VARIOUS ROUTES

Summary. *In the present article we proved the possibility of toxicological safety assessment for neuroretinoprotective drugs, using the complex approach to evaluation of intracellular metabolic functional parameters in different ophthalmic structures (retina, optic nerve and anterior corneal epithelium), by the example of ademol administered in various routes. The physiological normal ranges have been determined for neuronal specific enolase activity, cell cycle metrics based on flow cytometry data, oxidative and nitrosative stress markers (malondialdehyde level, carbonyl groups of protein, glutathioneperoxidase activity, nitrite and nitrate balance and adenosine triphosphoric acid content as an indicator of energy processes). We also identified the changes of mentioned above parameters on the background of neuroretinoprotective drug ademol. The other researches may use the physiological normal ranges determined by us for comparative assessment of metabolic processes in the retinal cells under different pathological conditions.*

Key words: neuron specific enolase, flow cytometry, retina, optic nerve, cornea, ademol.

Рецензент: д.мед.н., професор Гунас І.В.

Стаття надійшла до редакції 1.06.2015 р.

Черешнюк Ігор Леонідович - к. мед.н., ст. н. співроб. науково-дослідного центру ВНМУ ім.М.І.Пирогова, лікар-офтальмолог вищої категорії; +38 068 210-21-01; vin19@yandex.ru

Комнацька Катерина Миколаївна - асистент кафедри очних хвороб ВНМУ ім.М.І.Пирогова, лікар-офтальмолог; +38 098 385-62-73; komnatskaya88@mail.ru

Повх Вячеслав Леонідович - лікар-офтальмолог вищої категорії ПП "Лікарня Святого Луки"; +38 097 440-66-46; slaomed@ukr.net

Ходаківський Олексій Анатолійович - д. мед. н., доцент, Радник Генерального директора по науці фармацевтичної фірми "Дарниця"; +38 098 791-05-33; aleksey.hodakovskiy@bk.ru
