
© Повх В.Л., Ходаківський О.А., Черешнюк І.Л., Прокопенко С.В.

УДК: 615.27:617.7-005.4:57.085

Повх В.Л.¹, Ходаківський О.А.¹, Черешнюк І.Л.^{1,2,3}, Прокопенко С.В.³

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, ¹Навчально-науково-дослідна лабораторія з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно активних сполук "Фармадар", ²кафедра очних хвороб, ³науково-дослідний центр (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ВПЛИВУ АМАНТАДИНУ СУЛЬФАТУ ТА МЕМАНТИНУ НА ІНТЕНСИФІКАЦІЮ НЕЙРОЦИТОДЕСТРУКТИВНИХ, АПОПТОТИЧНИХ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗМІН У СІТКІВЦІ КРОЛІВ ЗА КОНТУЗІЇ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА

Резюме. Перші 7 днів модельної контузії ока, яка викликана впливом на зоровий аналізатор потоку вуглекислого газу під тиском, характеризується одночасною інтенсифікацією некротичних (нейродеструктивних), апоптотичних та проліферативних процесів у сітківці кролів. На користь чого в кінці першої доби експерименту свідчило вірогідне відносно показників інтактних тварин зростання активності NSE в середньому в 43,31 рази, підвищення відсоткового співвідношення клітин з ознаками фрагментації ядерної ДНК (апоптоз) в 14,66 разу, зростання кількості клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S - проліферативна активність) до їх загального числа в суспензії тканини у середньому в 4,41 рази та вірогідна ескалація титрів білка S100 на 7 добу контузії в 39,67 рази. Розчин амантадину сульфату дозою 2,5 мг/кг доведено та таблетована форма мемантину 20 мг/кг внутрішньошлунково, сприяли зниженню відносно групи контрольної патології відсотка клітин з ознаками фрагментації ядерної ДНК на 51,1 та 25,3%, або таких, що перебувають у фазі S циклу в середньому відповідно на 44,0 та 25,3% ($p < 0,05$). При цьому, ефективність оригінального препарату ПК-Мерц (амантадину сульфат) вірогідно перевищувала пероральний адамантан за антиапоптотичною активністю в середньому на 34,5%, а за антипроліферативною дією на 25,0% відповідно. Нарізне введення амантадину сульфату або мемантину сприяло вірогідній деескалації у крові кролів активності NSE на 24 год експерименту в 1,89 і 1,59 рази та титрів білка S100 на 7 добу контузії ока в середньому відповідно у 1,74 і 1,53 рази. Обидва препарати, як мемантин, так і амантадину сульфат, є носіями нейроретинопротекторної дії, яка пов'язана із

реалізацією на тлі їх введення в умовах контузії ока цитопротекторного, анитапoptотичного та антипроліферативного ефектів. За своєю дією амантадину сульфат умовно-ефективною дозою 2,5 мг/кг, вірогідно переважає мемантин 20 мг/кг в/ш.

Ключові слова: контузія ока, амантадину сульфат, мемантин, апоптоз, нейрон-специфічна енолаза, білок S100.

Вступ

Інтенсифікація реплікаційної активності ядерної ДНК окремих неспеціалізованих клітин зорового аналізатора (нейрогліальні елементи) внаслідок некротичних або апоптотичних процесів в сітківці, є її закономірною патоморфологічною відповіддю на альтерацію у постконтузійний період травми ока. Нами переконливо доведено, що в умовах даної патології для оцінки величини та ступеня деструкції нейронів гангліонарних шарів сітківки, можна використати зміни в сироватці активності нейрон-специфічної енолази (NSE). Вивільнення ферменту NSE з нейроцитів у кров (підвищення активності), є маркером пошкодження мембранної цілісності [5]. І навпаки, вірогідна деескалація активності NSE на тлі терапії цитопротекторами - свідчення їх нейропротекторного ефекту [4, 5]. Інтенсифікація проліферативних явищ в нейрогенних структурах сітківки, перш за все, асоціюється із поділом нейроглії, що можна ідентифікувати за допомогою специфічних енізиматичних тестів (зміни тирів білка S 100) та, використовуючи протоковий ДНК-цитометричний аналіз, який дозволяє вирахувати відсоток клітин, ядерна ДНК котрих знаходиться в процесі реплікації, тобто йде підготовка до мітозу сполучно-тканинних структур [1-5]. За даними наших попередніх досліджень [1-6], присвячених порівняльній оцінці впливу деяких блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні та деструктивно-дегенеративні явища в сітківці на тлі модельної ішемії-реперфузії ока, найбільш суттєву дію на окреслені процеси має амантадину сульфат та мемантин. В цій роботі, поряд із використанням в якості нейромаркеру NSE, монітувалися зміни титрів білка S100 та залучався метод протокової цитометрії. Отже, досліджувані блокатори NMDA-рецепторів перспективні для їх доклінічної оцінки за новим призначенням в якості нейроретинопротекторів при травмі ока, а окреслені методики - адекватні для вирішення поставленої мети.

Мета - використовуючи у постконтузійний період травми ока протоковий цитометричний аналіз у комплексі з верифікацією змін активності та титрів нейромаркерів, оцінити ефективність блокаторів NMDA-рецепторів, як можливих нейроретинопротекторів в умовах даної патології.

Матеріали та методи

Роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) імені М.І. Пирогова у рамках тем: "Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті" та "Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів", номери держреєстрації відповідно - 0112U0021939 та 00115U007126.

Експерименти, що були присвячені впливу модулаторів активності NMDA-рецепторів: амантадину сульфату та мемантину на інтенсифікацію апоптотичних та проліферативних змін в сітківці при конзузійній травмі зорового аналізатора проведено на кролях-самцях породи Шиншила віком 10 місяців і масою 3,0-3,3 кг. Усі тварини знаходились у віварії ВНМУ імені М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні при природному освітленні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру Міністерства охорони здоров'я 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".

Контузіїю ока у кролів, викликану дією потоку вуглекислого газу під тиском створювали за власне розробленою методикою [3], використовуючи газобалонний пневматичний пістолет марки "Байкал МР-654К" (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) та балони вуглекислого газу (маса зрідженого CO₂ - 12 г) під тиском (Crosman, США, № серії 456739). Постійність тиску CO₂ на рівні дульного зрізу контролювали, шляхом попередньої реєстрації швидкості польоту сферичної сталевий кульки (Кросман, США, № серії 03675482), калібром 4,5 мм масою 0,3 г на відстані 1 см від внутрішнього дульного отвору через індукційний наддульний хронометр X 741 (Україна). При цьому було встановлено, що при використанні балонів вуглекислого газу (t повітря = 19 C°, P_{атм} = 720-755 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 110-105 м/с. При таких швидкісних характеристиках, на рівні дульного зрізу тиск вуглекислого газу був однаково незмінним і дорівнював 7,4-7,5 Дж, що дозволяє моделювати контузіїю ока в однакових умовах у всіх серіях при використанні балону вуглекислого газу, не більш ніж як у 10 експериментальних пострілах. При моделюванні контузіїю ока у кролів, отвір затворної рами пневматичного пістолету був притулений до центру рогівки ока тварини, попередньо наркотизованої пропофолом дозою 40 мг/кг в/в (Fresenius Kabi, Австрія).

Через годину після пострілу, здійснювали перше введення досліджуваних препаратів: розчин амантадину сульфату для внутрішньовенних (в/в) інфузій ("ПК-МЕРЦ", Merz Pharmaceuticals, Швейцарія) та таблетовану форму мемантину ("Мема" Актавіс-Україна, Україна) з інтервалом 12 год. Амантадину сульфат (2,5 мг/

кг) застосовували довенно за допомогою інфузоматної системи упродовж 2 год у попередньо катетеризовану (катетер, ERG 22 G, Польща). Мемантин (20 мг/кг) вводили перорально через орогастральний зонд у вигляді його суспензії з твіном-80, розраховуючи концентрацію таким чином, щоб її об'єм становив 5 мл/кг. При травмах ока, коли відбувається офтальмогіпотензія, для амантадину сульфату, на нашу думку, більш доречною дозою саме 2,5 мг/кг, оскільки це не призводить до додаткового зниження ВОР і, така концентрація препарату, є носієм нейроретинопротективної активності [4]. Аналогічним положенням ми керувались при виборі дози для мемантину. Групі контрольної патології в/в вводили 0,9% розчин NaCl (2 мл/кг), аналогічно до вищеописаного дизайну. Терапія тривала упродовж однієї, або семи діб (при оцінці змін білка S 100) після нанесення травми.

Для проведення цитометричних досліджень сітківки [1], через 24 год після моделювання патології очі швидко підлягали енуклеації з подальшою промивкою холодним розчином 0,9% NaCl (+4°C - +8°C). Очні яблука кролів позбавляли залишок кон'юнктиви та м'язів і за допомогою мікрохірургічного інструментарію видалялися передній відділ ока і кришталик. Після 4 надрізів залишки очного яблука розправлялись таким чином, щоб очне дно було доступне огляду, помічались і видалялась ділянки сітківки. Вміст ДНК в ядрах клітин сітківки кролів визначався методом протокової цитометрії на багатофункціональному науково-дослідному протоковому 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 діамідинофеніліндол (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; G2 + M - відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G2 + M клітинного циклу із вмістом ДНК = 4с до їх загальної дослідної кількості; IPg - індекс проліферації, який визначається за сумою показників S + G2 + M; BP - блок проліферації, який оцінюється по співвідношенню S/(G2 + M) (збільшення кількості клітин, які перебува-

ють у фазі G2 + M клітинного циклу при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії G2 + M. 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.

Динаміку активності та рівня нейромаркерів (NSE та білка S 100) в сироватці крові, яку забирали з крайової вени вуха, верифікували відповідно наприкінці першої та сьомої доби методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням наборів NSE ELISA KIT (DAI, США) та S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) на приладі фірми "Hipson" (Чехія) [1, 5].

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Стьюдента у випадках нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W. Уайта - за його відсутності. Аналіз ДНК гістограм виконували засобами програмного забезпечення проточного цитометру FloMax (Partec, Німеччина). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Проведене дослідження показало, що при холостому (лише вуглекислий газ під тиском) пострілі із пневматичного пістолету впритул до центру рогівки ока кролів, через 24 год після моделювання патології, активність маркера мембранної цілісності нейронів вірогідно підвищилась відносно початкових значень в середньому в 43,31 рази (табл. 1). Подібне зростання активності NSE, вказує на розвиток суттєвої деструкції нейронів гангліонарних шарів сітківки (нейронекроз).

Паралельно до розвитку некробіотичних змін, в сітківці кролів групи контрольної патології нами відмічена і апоптотична активність, про що красномовно свідчило збільшення в середньому в 14,66 рази пулу клітин, які перебували у фазі SUB-G0G1 (апоптоз), $p < 0,05$ (табл. 4 та рис. 1). За визначенням Номенклатурного комітету по клітинній смерті (NCCD) апоптоз - це впорядкований, генетично детермінований процес елімінації пошкоджених клітин, морфологічний критерій незворотності якого, визначається фрагментацією ядерної ДНК [7]. Аналізуючи такі зміни можна дійти висновку, що у тварин контрольної патології в умовах контузії ока, вірогідне зростання кількості клітин сітківки, що перебувають у фазі SUB-G0G1, тобто мають ознаки фрагментації ДНК, є свідченням розвитку апоптозу (табл. 4 та рис. 1).

Поряд із цим, в аналогічний період експерименту у групі контрольної патології відмічалось вірогідне відносно інтакту наростання проліферативної активності ретинальних клітин (в першу чергу за рахунок нейрогліальних). На користь подібного твердження вказувало достовірне наростання відсоткового співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у суспензії тканини в середньому в 4,41 рази (табл. 3 та

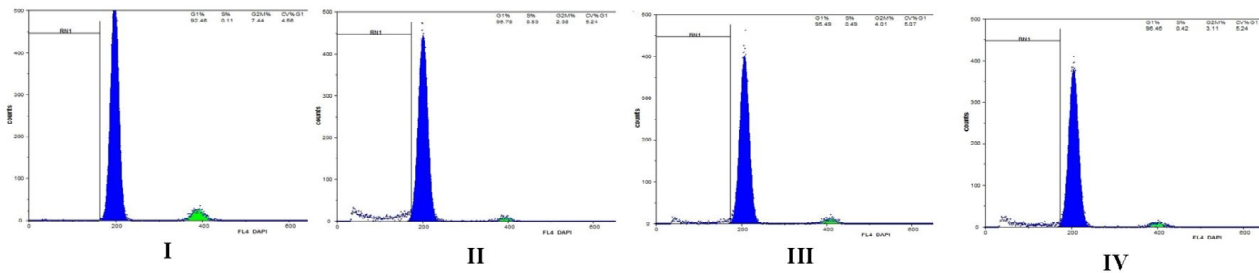


Рис. 1. Приклад обробленої ДНК-гістограми ядерної суспензії клітин сітківки інтактного кроля (I) та тварин із контузією на 7 добу, які отримували: II - 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія), III - розчин амантадину сульфату дозою 2,5 мг/кг в/в та IV - мемантин 20 мг/кг в/ш.

рис. 1). Відомо, що досліджуваний показник, є відповіддю сполучної тканини на альтераційний процес. Отже, інтенсифікація фази S клітинного циклу, характеризує початок заміщення зруйнованих клітин сітківки, зокрема її гангліонарних шарів на сполучнотканинні (нейрогліальні) елементи. Цей феномен, поряд із ескалацією нейрональних маркерів, таких як нейрон-специфічна енолаза (NSE), або білок S100, корелює із площею ураження сітківки. У наших попередніх роботах, ми підтвердили, і довели доцільність використання ензиматичних тестів по визначенню нейромаркерів в динаміці з першої до сьомої доби травми зорового аналізатора для оцінки величини та глибини ураження сітківки, а також ефективності нейроретинопротекторів [3].

Наприкінці досліду (7 доба), табл. 2, рівень маркера (білок S100), який як і фаза S, віддзеркалює активацію поділу нейроглії, а значить, опосередковано, і ступінь та кількість зруйнованих нейронів гангліонарних шарів сітківки, зріс відносно початкових значень в середньому в 39,67 рази ($p < 0,05$). Отримані дані засвідчують значне первинне ураження масиву нейронів сітківки та збереження проліферативних процесів на 7 добу після травми.

Таким чином, при контузії ока, яка викликана дією потоку вуглекислого газу, вогнище деструктивно-дегенеративних змін в сітківці, є неоднорідним та гетерогенним, і формується за рахунок некротичних та апоптотичних процесів, які чітко розмежувати неможливо. Використовуючи біохімічні (визначення активності та моніторинг змін титрів нейромаркерів в крові) та цитологічні методи, можна встановити інтенсивність цих змін, а також внесок кожного типу смерті в загальну картину ураження зорового аналізатора. Так, зростання активності NSE, вказує про порушення мембранної цілісності нейронів гангліонарних шарів сітківки, і, власне про некроз (некробіоз). При цьому, біохімічно даному процесу, згодом на 7 добу експерименту, відповідає зростання рівня білка S100, який експресується гліоцитами у відповідь на некротичні та запальні зміни. Більш раннім передвісником цього, є підвищення відносної кількості клітин (гліальних та сполучнотканинних), які перебувають у фазі S клітинного циклу, оскільки саме вона вказує на їх готовність до поділу. Відомо, що сітківка

не спроможна регенерувати за рахунок спеціалізованих клітин, а поділ відбувається лише за рахунок нейрогліальних елементів, як відповідь на необоротну альтерацію. Про питому вагу у цих патоморфологічних змінах, власне апоптозу, можна судити саме за рівнем фрагментованої ядерної ДНК, оскільки нейромаркери вказують на ураження мембран, що є ознакою лише некрозу.

Обидва досліджувані препарати сприяли вірогідному зменшенню відносно тварин групи контрольної патології активності NSE в кінці першої доби модельної контузії (табл. 1). Це вказує на наявність у них нейроретинопротективної активності. Слід відмітити - виразність цього впливу виражена по-різному, що свідчить про

Таблиця 1. Вплив розчину амантадину сульфату та мемантину при їх нарізному введенні на активність нейрон-специфічної енолази у крові кролів через добу після модельної контузії ока ($M \pm m$, $n=8$).

Дослідні групи	Рівень активності NSE (нг/мл)
Інтактні кролі	0,35±0,021
Контузія + 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія)	15,158±0,263*
Контузія + амантадину сульфат, 2,5 мг/кг в/в	8,030±0,210*#^
Контузія + мемантин, 20 мг/кг в/ш	9,530±0,109*#

Примітки: в/в - внутрішньовенно, в/ш - внутрішньошлунково, NSE - нейрон-специфічна енолаза; * - $p < 0,05$ відносно інтактних тварин; # - $p < 0,05$ щодо контрольної патології; ^ - $p < 0,05$ щодо мемантину.

Таблиця 2. Вплив розчину амантадину сульфату та мемантину при їх нарізному введенні на титри білка S100 у крові кролів на 7 добу модельної контузії ока ($M \pm m$, $n=8$).

Дослідні групи	Титр білка S100 (нг/мл)
Інтактні кролі	0,568±0,025
Контузія + 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія)	22,53±0,773*
Контузія + амантадину сульфат, 2,5 мг/кг в/в	12,902±0,265*#^
Контузія + мемантин, 20 мг/кг в/ш	14,739±0,161*#

Примітки: в/в - внутрішньовенно, в/ш - внутрішньошлунково; * - $p < 0,05$ щодо інтактних тварин; # - $p < 0,05$ щодо контрольної патології; ^ - $p < 0,05$ щодо мемантину.

Таблиця 3. Вплив розчину амантадину сульфату та мемантину при їх нарізному введенні на відносну кількість клітин, що перебувають у фазі S синтезу ДНК до їх загальної кількості у суспензії сітківки кролів на 24 год терапії контузії ока, $M \pm \sigma$.

Дослідні групи	Відносна кількість клітин (у%), що перебувають у фазі S
Інтактні кролі	0,17 \pm 0,07
Контузія + 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія)	0,75 \pm 0,16*
Контузія + амантадину сульфат, 2,5 мг/кг в/в	0,42 \pm 0,13*#^
Контузія + мемантин, 20 мг/кг в/ш	0,56 \pm 0,19*#

Примітки: в/в - внутрішньовенно, в/ш - внутрішньошлунково; * - $p < 0,05$ щодо інтактних тварин; # - $p < 0,05$ відносно контрольної патології; ^ - $p < 0,05$ щодо мемантину.

Таблиця 4. Вплив розчину амантадину сульфату та мемантину при їх нарізному введенні на відносну кількість клітин що перебувають у фазі SUB-G0G1 з фрагментованою ядерною ДНК (апоптоз) до їх загальної кількості у суспензії сітківки кролів на 24 год терапії контузії ока, $M \pm \sigma$.

Дослідні групи	Відносна кількість клітин (у%), з фрагментацією ДНК (апоптоз)
Інтактні кролі	0,95 \pm 0,24
Контузія + 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія)	13,93 \pm 1,12*
Контузія + амантадину сульфат, 2,5 мг/кг в/в	6,81 \pm 1,45*#^
Контузія + мемантин, 20 мг/кг в/ш	10,40 \pm 2,62*#

Примітки: в/в - внутрішньовенно, в/ш - внутрішньошлунково; * - $p < 0,05$ щодо інтактних тварин; # - $p < 0,05$ відносно контрольної патології; ^ - $p < 0,05$ щодо мемантину.

неоднаковий за величиною ступінь їх захисного впливу на нейрони сітківки. Найбільш потужний нейроретинопротективний ефект проявив амантадину сульфат. На тлі його в/в застосування активність досліджуваного маркера знизилась відносно тварин, яким в якості терапії вводили 0,9% розчин NaCl (група контролю) в середньому в 1,89 рази ($p < 0,05$). Лікування кролів з моделлю контузією ока мемантином, супроводжувалось вірогідно меншою порівняно із амантадином сульфатом деескалацією активності NSE в середньому на 15,7%.

При курсову введенні амантадину сульфату або мемантину, взятих терапевтично-ефективними дозами відповідно 2,5 в/в та 20 мг/кг в/ш відбувались кількісно-якісні зміни у відсотковому співвідношенні клітин сітківки, що перебувають на різних етапах клітинного циклу. Так, число клітин у фазі S була вірогідно меншим порівняно з аналогічним показником у групі контрольної патології в середньому 44 та 25,3% (табл. 3 та рис. 1), що вказує на низьку активацію проліферативних процесів у цій групі, а значить і меншу (порівняно із моделлю патологією) альтерацію клітин сітківки. За силою та векторним напрямком антипроліферативної дії за цитометричним критерієм розчин амантадину суль-

фату вірогідно переважав мемантин в середньому на 25,0%.

Розчин амантадину сульфату доведено та таблетована форма мемантину в/ш, сприяли зниженню рівня фрагментованої ДНК в ядрах клітин сітківки відносно групи контрольної патології в середньому на 51,1 та 25,3% ($p < 0,05$). При цьому, ефективність оригінального препарату ПК-Мерц була вірогідно вищою за пероральний адамантан в середньому на 34,5%, (табл. 4 та рис.1).

В кінці спостереження (7 доба), за спроможністю зменшувати в сироватці крові рівень білку S100 розчин амантадину сульфату, знову ж таки, вірогідно перевершував мемантин (табл. 2). На тлі нарізного введення амантадину сульфату та мемантину, рівень досліджуваного маркера знизився відносно тварин, яким в якості терапії вводили 0,9% розчин NaCl (група контролю) в середньому в 1,74 та 1,53 рази ($p < 0,05$). Отже за критерієм деескалації досліджуваного нейромаркера, препарат ПК-Мерц вірогідно переважав мемантин в середньому на 12,5%.

Таким чином, обидва препарати, як амантадину сульфат, так і мемантин володіють нейроцитопротективною, апоптозмодульвальною та антипроліферативною активністю, що є провідними механізмами їх захисної дії на сітківку при модельній контузії ока. При цьому, за описаними ефектами, парантеральне застосування блокатора поліамінового сайту NMDA-рецепторів, достеменно, переважає пероральний прийом блокатора фенциклідинового сайту аналогічного рецепторно-іонофорного комплексу.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Перші 7 діб модельної контузії ока, яка викликана впливом на зоровий аналізатор потоку вуглекислового газу під тиском, характеризується одночасною інтенсифікацією некротичних (нейродеструктивних), апоптотичних та проліферативних процесів в сітківці кролів. На користь чого в кінці першої доби експерименту свідчило вірогідне відносно показників інтактних тварин зростання активності NSE в середньому в 43,31 рази, підвищення відсоткового співвідношення клітин з ознаками фрагментації ядерної ДНК (апоптоз) в 14,66 рази, зростання кількості клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S - проліферативна активність) до їх загального числа в суспензії тканини у середньому в 4,41 рази та вірогідна ескалація титрів білка S100 на 7 добу контузії в 39,67 рази.

2. Розчин амантадину сульфату дозою 2,5 мг/кг доведено та таблетована форма мемантину 20 мг/кг внутрішньошлунково, сприяли зниженню відносно групи контрольної патології відсотка клітин з ознаками фрагментації ядерної ДНК на 51,1 та 25,3%, або таких, що перебувають у фазі S циклу в середньому відповідно на 44,0 та 25,3% ($p < 0,05$). При цьому, ефективність

оригінального препарату ПК-Мерц (амантадину сульфат) вірогідно перевищувала пероральний адамантан за антиапоптотичною активністю в середньому на 34,5%, а за антипроліферативною дією на 25,0% відповідно.

3. Нарізне введення амантадину сульфату або мемантину сприяло вірогідній деескалації у крові кролів активності NSE на 24 год експерименту в 1,89 і 1,59 рази та титрів білка S100 на 7 добу контузії ока в середньому відповідно у 1,74 і 1,53 рази. За цими показниками препарат ПК-Мерц переважає мемантин в середньому на 15,7 та 12,5%, $p < 0,05$.

4. Обидва препарати, як мемантин, так і амантадину сульфат, є носіями нейроретинопротекторної дії, яка пов'язана із реалізацією на тлі їх введення в умовах контузії ока цитопротекторного, антиапоптотичного та антипроліферативного ефекту. За своєю дією амантадину сульфат умовно-ефективною дозою 2,5 мг/кг, вірогідно переважає мемантин 20 мг/кг в/ш.

Таким чином, досліджувані блокатори активності NMDA-рецепторів, є перспективними для застосування за новим призначенням в якості нейроретинопротекторних препаратів, що потребує більш ґрунтовної доклінічної оцінки.

Список літератури

1. 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 / І. Л. Черешнюк, В. Л. Повх, Г. В. Загорій, О. А. Ходаківський // Світ медицини та біології. - 2016. - № 2 (56). - С. 159-164.
2. Пат. на корисну модель № 104387 Україна МПК А61К 31/13 А61Р 27/06. Застосування фармацевтичної композиції, що містить амантадин або його фармацевтично прийнятні солі для лікування захворювань зорового аналізатора / Г. В. Загорій, І. Л. Черешнюк; замовник і патентовласник Г. В. Загорій. - № u 201507455; заявл. 24.07.15; опубл. 25.01.16, Бюл. № 2, 2016 р.
3. 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 / І. Л. Черешнюк, В. Л. Повх, К. М. Комнацька, О. А. Ходаківський; замовник і патентовласник І. Л. Черешнюк, В. Л. Повх, К. М. Комнацька, О. А. Ходаківський. - № u 201601703; заявл. 23.02.16; опубл. 25.08.16, Бюл. № 16, 2016 р.
4. Повх В.Л. Нейроретинопротекторні властивості модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні ока (експериментальне дослідження) / В. Л. Повх // Вісник морфології. - 2016. - Т. 22, № 1. - С. 53-57.
5. 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 / И. Л. Черешнюк, В. Л. Повх, Г. В. Загорий, О. В. Ходаковская // Врач-аспирант. - 2016. - Т. 74, №1.2. - С. 295-303.
6. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: *in situ* DNA fragmentation analysis / С. Charriat-Marlangue, M. Margail, A. Represa [et al.] // Blood Flow. Melab. - 2009. - Vol. 16. - P. 186-194.

Повх В.Л., Ходаковский А.А., Черешнюк И.Л., Прокопенко С.В.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АМАНТАДИНА СУЛЬФАТА И МЕМАНТИНА НА ИНТЕНСИФИКАЦИЮ НЕЙРОЦИТОДЕСТРУКТИВНЫХ, АПОПТОТИЧЕСКИХ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СЕТЧАТКЕ КРОЛИКОВ ПРИ КОНТУЗИИ ЗРИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗАТОРА

Резюме. Первые 7 суток экспериментальной контузии глаза, вызванной воздействием на зрительный анализатор потока углекислого газа под давлением, характеризовались одновременной интенсификацией некротических (нейроцитодеструктивных), апоптотических и пролиферативных процессов в сетчатке кроликов. Об этом свидетельствовали достоверное относительно показателей интактных животных увеличение активности NSE в среднем в 43,3 раза, рост процентного соотношения клеток с признаками фрагментации ядерной ДНК (апоптоз) и увеличение числа клеток в фазе синтеза ДНК (фаза S - пролиферативная активность) к их общему количеству в суспензии ткани в среднем в 14,66 и 4,41 раза ($p < 0,05$), а также и достоверная эскалация титров белка S100 на 7 сутки в 39,7 раза. Раствор амантадина сульфата дозой 2,5 мг/кг внутривенно (в/в) и таблетированная форма мемантина из расчета 20 мг/кг внутривенно (в/ж), способствовали снижению относительно группы контрольной патологии процента клеток с признаками фрагментации ядерной ДНК на 51,1 и 25,3%, а также таких, которые находятся в фазе S клеточного цикла в среднем соответственно на 44,0 и 25,3% ($p < 0,05$). При этом, эффективность оригинального препарата ПК-Мерц (амантадина сульфат) достоверно превышала пероральный адамантан за антиапоптотической активностью в среднем 34,5%, а по антипролиферативному действию превосходила его на 25%. Раздельное введение амантадина сульфата или мемантина способствовало достоверной деэскалации в крови кроликов активности NSE через 24 ч эксперимента в среднем в 1,89 и 1,59 раза, а титров белка S100 на 7 сутки контузии глаза в 1,74 и 1,53 раза соответственно. Оба препарата, как мемантин, так и амантадина сульфат, являются носителями нейроретинопротекторной активности, которая связана с реализацией на фоне их введения в условиях контузии глаза цитопротекторного, антиапоптотического и антипролиферативного действия. По своей эффективности в условиях модельной контузии глаза, амантадина сульфат условно-эффективной дозой 2,5 мг/кг в/в достоверно превосходит мемантин 20 мг/кг в/ж.

Ключевые слова: контузия глаза, амантадина сульфат, мемантин, апоптоз, нейрон-специфическая энолаза, белок S100.

Povkh V.L., Khodakovskiy A.A., Chereshnyuk I.L., Prokopenko S.V.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECT OF AMANTADINE SULPHATE AND MEMANTINE ON THE INTENSIFICATION OF NEUROCYTODESTRUCTIVE, APOPTOTIC AND PROLIFERATIVE CHANGES IN THE RETINA OF RABBITS WITH A CONTUSION OF THE VISUAL ANALYZER

Summary. The first 7 days of the experimental eye contusion, caused by exposure to the visual analyzer of carbon dioxide flow

under pressure, characterized by the simultaneous intensification of necrotic (neurocytodestructive), apoptotic and proliferative processes in the retina of rabbits. This was evidenced by a significant relative increase in the indices of intact animals NSE activity in average 43,3 fold increase in the percentage of cells with nuclear DNA fragmentation signs (apoptosis), and increase the number of cells in the DNA synthesis phase (phase S - proliferative activity) to the total number of tissue suspension on average 14,66 times, and 4,41 ($p < 0,05$), as well as significant escalation of S100 protein titers on 7 day in 39,7 times. Amantadine sulphate solution dose of 2.5 mg/kg intravenously (i/v) and pelletized form of memantine 20 mg/kg intragastric (i/g) to have reduced relative to the control group pathology percentage of cells with nuclear DNA fragmentation signs on 51,1 and 25,3%, and those which are in S-phase of the cell cycle respectively on average on 44,0 and 25,3 % ($p < 0,05$). At the same time, the effectiveness of the original drug PK-Merz (amantadine sulfate) was significantly higher for oral adamantane antiapoptotic activity on average 34,5 %, and exceeded its antiproliferative effect by on 25 %. Separate administration of amantadine sulphate or memantine contributed accurate de-escalation in the blood of rabbits NSE activity after 24 hours of the experiment an average of 1,89 and 1,59 times, and the S100 protein titers on 7 day in the eyes contusion 1,74 and 1,53 times, respectively. Both drugs as memantine, and amantadine sulfate, are carriers neurocytodestructive activity that is associated with the implementation of the background to their administration in a contusion cytoprotective eyes anitapoptotic and antiproliferative action. By its efficiency in terms of the model eye contusion, amantadine sulfate conditionally effective dose of 2,5 mg/kg i/v in significantly superior memantine 20 mg/kg i/g.

Key words: eye contusion, amantadine sulphate, memantine, apoptosis, neuron-specific enolase (NSE), the S100 protein.

Рецензент - д.мед.н., проф. Волощук Н.І.

Стаття надійшла до редакції 31.08.2016р.

Повх Вячеслав Леонідович - ст. лаборант науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук "ФАРМАДАР"; +38(098)7910533; slaomed@ukr.net

Черешнюк Ігор Леонідович - к.мед.н., ст. наук. співроб. науково-дослідного центру ВНМУ імені М.І. Пирогова, лікар-офтальмолог вищої категорії, асистент кафедри офтальмології; +38(068)2102101; vin19@yandex.ru

Ходаківський Олексій Анатолійович - д.мед.н., зав. науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук "ФАРМАДАР", Радник Генерального директора по науці фармацевтичної фірми "Дарниця", доц. кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(098)7910533; aleksey.hodakovskiy@bk.ru

Прокопенко Сергій Васильович - к.мед.н., ст. н. співроб., директор науково-дослідного центру ВНМУ ім. М.І. Пирогова; +38(097)3308683; aleksey.hodakovskiy@bk.ru
