

УДК 615.015.42-44:616-005.4:617.735

*І.Л. Черешнюк<sup>1</sup>, Г.В. Загорій<sup>2</sup>, О.А. Ходаківський<sup>1</sup>***ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У СІТКІВЦІ ЩУРІВ В УМОВАХ ГОСТРОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ОКА (ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛІ) ТА ОЦІНКА РЕТИНОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕКСИДОЛУ**<sup>1</sup>Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ

**Резюме.** У представленій статті, на основі результатів власних досліджень, наведено деякі патобіохімічні механізми, які інтегруються в розвиток експериментального постреперфузійного ішемічно-гіпоксичного ураження зорового аналізатора при перехідній 60-хвилинній ішемії-реперфузії ока у щурів. Проаналізовано місце і роль енергодефіциту, оксидативного стресу та порушень обміну монооксиду азоту у формуванні пошкоджень сітківки.

Проведено оцінку наявності та ступеня виразності коригувального впливу мексидолу на вказані метаболі-

чні процеси за умов даної патології. Встановлено, що аноксія ока, упродовж години з подальшою реперфузією, супроводжується типовими внутрішньоклітинними патофізіологічними змінами, що вказує на репрезентативність даної моделі для фармакологічної оцінки біологічноактивних речовин із ретинопротекторною активністю. Мексидол, завдяки своєму модульовальному впливу на метаболізм, може використовуватись як референсний препарат.

**Ключові слова:** мексидол, ретинопротекція, сітківка, ішемія-реперфузія ока.

**Вступ.** Зоровий аналізатор та головний мозок є взаємозв'язаними органами-мішенями судинної патології (гіпертонічна хвороба, артеріальні гіпертензії, цукровий діабет, тромбози, емболії, атеросклероз та ін.), а зміни метаболізму нейронів сітківки та ЦНС в умовах гострої редукції кровообігу в оці та мозку схожі та відбуваються стадійно, що дозволяє розробити інтегровані підходи до терапії цереброваскулярної патології та ретинопатій різного генезу [12]. Зокрема, енергодефіцит, метаболічний ацидоз, оксидативний стрес та дисбаланс у обміні монооксиду азоту, які є ключовою ланкою у початку деструктивно-дегенеративних явищ при ішемічних ураженнях мозку, мають місце і в сітківці, та являють собою потенційну мішень щодо можливих розробок напрямів патогенетичної корекції цих станів [6].

Поява значної кількості нових метаболітотропних лікарських засобів із цитопротекторним впливом на нейрони (цитиколін, кортексин, корвітин, тіотриазолін, мексидол та ін. похідні бурштинової кислоти) дає змогу сподіватися на їх ефективність не тільки в умовах церебральної недостатності, а й при ішемічно-гіпоксичному ураженні сітківки [8].

Слід окремо відмітити, що для дослідження особливостей ішемічного ураження зорового аналізатора, на сьогодні розроблено низку експериментальних станів [11]. Використання адекватних та репрезентативних моделей ішемії сітківки у тварин необхідно для того, щоб передбачити значення і вплив терапевтичних підходів лікування для людини. Свою увагу ми зосередили на перехідній тотальній ішемії ока у щурів.

**Мета дослідження.** Охарактеризувати адекватність моделі ішемії-реперфузії (ІР) ока у щурів за критеріями внутрішньоклітинних (метаболічних) змін у сітківці, а також можливість модуляції цих процесів мексидолом.

**Матеріал і методи.** Оцінку ретинопротекторних властивостей мексидолу («Мексидол», НВК Фармасофт, Росія), проведено на 30 щурів-самців лінії Вістар масою 160-180 г. Усі тварини знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (ВНМУ) на стандартному водно-харчовому раціоні при природному освітленні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися методичних рекомендацій державного фармацевтичного центру Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України і вимог біоетики згідно з Національними «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [7, 14]. Дослідження проводили в науково-дослідній лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ імені М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №003/10 від 11 січня 2010 р.) та на базі клінічно-діагностичної лабораторії кафедри біохімії (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.)

Для відтворення модельної ішемії сітківки використовували модель однієї ІР ока у щурів шляхом накладання та подальшого затягування лігатур до зникнення кровотоку в судинах сітківки (термін експозиції 1 год). Через 60 хв після ішемії ретробульбарні лігатури обережно розпускали і знімали – кровообіг у судинах ока відновлювався самостійно. Стан судин очного дна контролювали за допомогою прямої офтальмоскопії (попередньо наносили на рогівку гель) через покривне скло [11].

В умовах модельної ІР мексидол вводили в лікувальному режимі внутрішньоочеревинно (в/о) дозою 100 мг/кг, яка забезпечує максимальну

реалізацію його нейропротекторних, протигіпоксичних та антиоксидантних властивостей [Ходаківський О.А., 2014]. Терапію розпочинали через 30 хв після накладання ретробульбарної лігатури з наступним уведенням досліджуваних речовин з інтервалом 12 год (двічі на добу). Група контрольної патології (тварини з ІР) отримувала 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/о. Псевдооперованих щурів піддавали всім втручанням (наркоз, офтальмоскопія, накладання ретробульбарної лігатури за винятком її затягування).

Травматичні маніпуляції (накладання лігатур) та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг в/о) [10] («Fresenius Kabi», Австрія).

Зміни метаболічних показників у сітківці ока щурів оцінювали через 24 год ІР ока. Сітківку промивали холодним 1,15 % розчином KCl та гомогенізували у середовищі 1,15 % розчину KCl (співвідношення 1:3). Пост'ядерну фракцію отримували з гомогенатів шляхом центрифугування (30 хв, 1500g при +4°C). Стан енергетичного та вуглеводного обміну в сітківці оцінювали за вмістом аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ). Вміст АТФ визначали в безбілковому трихлороцтовому екстракті сітківки ока 1:5 (10 % розчин трихлороцтової кислоти) хроматографічним методом [Прохорова М. И., 1982]. Вміст загального білка визначали мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта [5]. Інтенсивність оксидативного стресу в сітківці визначали за кінцевим продуктом цього процесу – малоновим альдегідом (МА) 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 (ГПР). Вміст МА визначали за реакцією з тіобар-

бітуровою кислотою [1], КГП – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідрaziном [3]. Сумарний вміст нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині амоніаку [4]. Активність ГПО визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненого глутатіону [2].

Результати обробляли за допомогою статистичної програми StatPlus 2009. Використовували непараметричний критерій W Уайта, парний критерій Т Вілкоксона для визначення значущих змін у динаміці в середині групи.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Однією із ланок патогенезу гострої ішемії сітківки є енергодефіцит та зменшення в її клітинах (особливо нейрональних) вмісту АТФ. Нами встановлено, що на тлі 60 хв ІР ока в сітківці щурів виявляються порушення енергетичного обміну, про що свідчить достовірне зменшення запасів основного макроерга АТФ на 47,6 %, порівняно з показником у псевдооперованих тварин (рис. 1). Ймовірно, дефіцит АТФ у сітківці за цих умов є наслідком неефективного поєднання тканинного дихання з окисним фосфорилуванням, що формується на тлі порушення цілісності внутрішньої мембрани мітохондрій під впливом оксидативного, нітрозативного стресу та інших дестабілізуювальних чинників.

Використання мексидолу виявляє достовірно позитивний вплив на енергетичний обмін у сітківці щурів на тлі ІР ока. Так, у групі тварин, які отримували мексидол, зростання вмісту АТФ становило 36,4 %, порівняно з тваринами групи контрольної патології.

Другим, не менш важливим механізмом у патобіохімічному каскаді гострої ішемії сітківки, є розвиток оксидативного стресу, процесів ліпопероксидації та ОМБ, які ініціюються при одно-

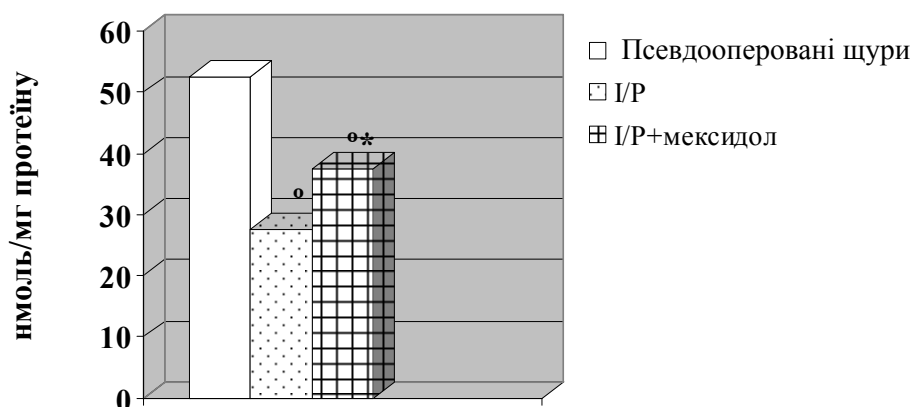


Рис. 1. Вплив мексидолу на вміст АТФ у сітківці щурів через 24 год після ішемії-реперфузії ока

Примітка. 1. I/R – ішемія-реперфузія; 2. ° –  $p < 0,05$  відносно групи псевдооперованих тварин; 3. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології

Таблиця

Вплив мексидолу на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів у сітківці щурів через добу після ішемії-реперфузії ока ( $M \pm m, n=10$ )

Характеристика груп тварин	Показники	
	МА, нмоль / мг протеїну	КГП, нмоль / мг протеїну
Псевдооперовані тварини + 0,9% NaCl	3,32±0,12	1,15±0,06
Група контрольної патології, IP + 0,9% NaCl	6,58±0,18 °	2,08±0,09 °
IP+ мексидол (100 мг/кг)	5,14±0,20 °*	1,75±0,08 °*

Примітка. IP – ішемія-реперфузія; ° –  $p < 0,05$  відносно групи псевдооперованих тварин; \* –  $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології

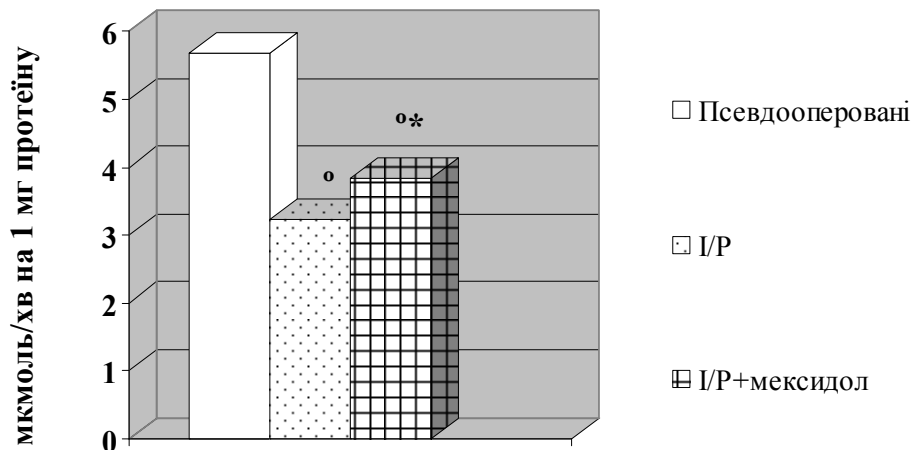


Рис. 2. Вплив мексидолу на активність глутатіонпероксидази в сітківці щурів через 24 год після ішемії-реперфузії ока

Примітка. I/P – ішемія-реперфузія; ° –  $p < 0,05$  відносно групи псевдооперованих тварин; \* –  $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології

часному зменшенні активності власних антиоксидантних ферментів.

Результати власних досліджень підтверджують цю тезу. У щурів на тлі IP ока в сітківці відмічається гіперактивація процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів (табл.), про що доказово свідчить статистично вірогідне зростання вмісту МА (на 98,2 %) та КГП (на 80,9 %), відносно відповідних показників у псевдооперованих тварин.

У групі тварин, які отримували мексидол (100 мг/кг в/о), вміст МА та КГП у сітківці ока був відповідно на 21,9 та 15,9 % меншим, ніж у щурів групи контрольної патології.

Посилення процесів окиснювальної модифікації ліпідів та протеїнів у тварин з IP ока формується на тлі виснаження антиоксидантних систем (рис. 1).

У щурів з IP ока в сітківці реєструється достовірне зменшення активності потужного антиоксидантного ферменту ГПО в середньому на 43,3 %, порівняно з таким показником у групі псевдооперованих тварин. Фармакотерапія мексидолом супроводжується зростанням активності глутаті-

онпероксидази на 18,9 % відносно тварин групи контрольної патології ( $p < 0,05$ ).

За умов IP ока, поряд із оксидативним стресом, у сітківці щурів розвивається нітрозативний стрес, доказом чого є статистично достовірне ( $p < 0,05$ ) зростання вмісту стабільних метаболітів нітроген монооксиду – нітритів та нітратів у середньому в 3,5 раза (рис. 2). Накопичення радикала нітроген монооксиду та супероксидного аніон-радикала є досить несприятливим чинником, адже супроводжується утворенням реакційно здатного пероксинітриду, який володіє високою цитотоксичністю, викликає ковалентну модифікацію редокс-чутливих протеїнів, що супроводжується зміною активності різних ензиматичних систем.

Фармакотерапія мексидолом до певної міри стримує формування нітрозативного стресу. У групі тварин, які на тлі IP ока отримували мексидол, сумарний вміст нітритів та нітратів в сітківці ока був на 21,0 % меншим, порівняно з тваринами групи контрольної патології.

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать, що модельна IP ока супрово-

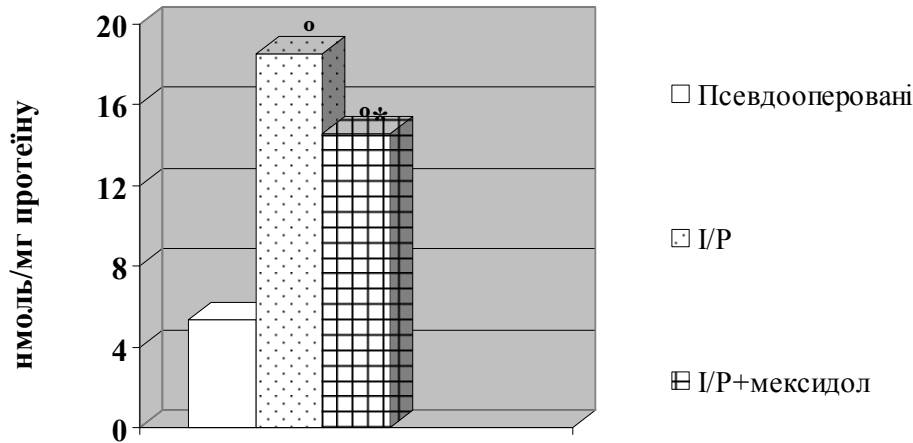


Рис. 3. Вплив мексидолу на сумарний вміст нітритів та нітратів у сітківці щурів через 24 год після ішемії-реперфузії ока

Примітка. I/P – ішемія-реперфузія; ° –  $p < 0,05$  відносно групи псевдооперованих тварин; \* –  $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології

джується розвитком низки метаболічних пертурбацій: активуються процеси окисної модифікації ліпідів та протеїнів на тлі зниження активності антиоксидантного ензиму ГПО, формується нітрозативний стрес та порушується енергетичний обмін. Використання за цих умов мексидолу сприяє поповненню пулу АТФ, пригніченню ліпопероксидації та окисної модифікації протеїнів, збільшенню активності ГПО, а також має депримуєчий вплив на розвиток нітрозативного стресу. Слід відмітити, що мексидол виявляє позитивний модулювальний вплив на енергетичний обмін, процеси нітрозативного, оксидативного стресу та стан системи про-антиоксидантів. Отже, перехідна 60-хвилинна ІР ока віддзеркалює типові внутрішньоклітинні зміни в умовах ішемічно-гіпоксичного ураження сітківки, що робить цю модель репрезентативною для фармакологічної оцінки біологічноактивних речовин із ретинопротекторною активністю, а мексидол завдяки своєму модулювальному впливу на метаболізм може використовуватись як референсний препарат.

#### Висновки

1. 60-хвилинна ішемія-реперфузія ока через 24 год після моделювання патології супроводжувалася наступними біохімічними змінами в сітківці відносно інтактних тварин: енергодефіцитом (рівень АТФ знизився в середньому на 47,6 %), розвитком оксидативного стресу (вміст малонового альдегіду та карбонільних груп зріс відповідно на 98,2 та 80,9 %, а активність глутатіонпероксидази зменшився на 43,3 %) та дисбалансом у системі монооксиду азоту (вміст стабільних метаболітів нітроген монооксиду – нітритів та нітратів підвищився приблизно в 3,5 раза).

2. Застосована модель ішемії-реперфузії ІР, віддзеркалює типові внутрішньоклітинні зміни в

умовах ішемічно-гіпоксичного ураження сітківки, що робить її репрезентативною для фармакологічної оцінки біологічноактивних речовин із ретинопротекторною активністю.

3. Мексидол (100 мг/кг) сприяє поповненню пулу АТФ, пригніченню ліпопероксидації та окисної модифікації протеїнів, збільшенню активності глутатіонпероксидази, а також має депримуєчий вплив на розвиток нітрозативного стресу.

**Перспективи подальших досліджень.** Застосування моделі тотальної ІР ока є перспективною для вивчення впливу ретинопротекторних засобів на внутрішньоклітинні (метаболічні) зміни в сітківці в умовах її ішемічно-гіпоксичного ураження.

#### Література

1. Владимиров Ю.В. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.В. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
2. Власова С.Н. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Перслегина // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19-22.
3. 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 // Вісн. Вінниць. держ. мед. ун-ту. – 2003. – № 7 (2/2). – С. 664-666.
4. Коренман И.М. Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
6. Максимов И.Б. Нейропротекция в офтальмологии: сб. научных статей / И.Б. Максимов, В.В. Нероев. – СПб.: Наука, 2007. – 152 с.
7. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / ред. Н.А. Ляпунов и др. – К.: МОРИОН, 1999. – С. 508-545.
8. Павлюченко К.П. Эффективность традиционного лечения больных с острыми нарушениями кровообра-

- шения в сетчатке и зрительном нерве: ближайшие и отдаленные результаты / К.П. Павлюченко, В.С. Джоджуа, С.Ю. Могилевский // Пит. эксперим. та клін. мед.: зб. статей. – Донецьк, 2008. – Вип. 12, Т. 2. – С. 230-235.
9. Прохорова М.И. Современные методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. – Л.: Из-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
  10. Ходаківський О.А. Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда (експериментальне дослідження): автореф. дис. д. мед. н.: спец. 14.03.05 – фармакологія / О.А. Ходаківський. – Одеса, 2014. – 24 с.
  11. Minhas G. Preclinical Models to Investigate Retinal Ischemia: Advances and Drawbacks / G. Minhas, R. Morishita, A. Anand // J. Front Neurol. – 2012. – Vol. 75, № 3. – P. 1-6.
  12. Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischemia to the retina / N.N. Osborne, L. DeSantis, J.H. Bae [et al.] // Exp. Eye Res. – 1999. – Vol. 69. – P. 331-342.
  13. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion / S.S. Prasad, L. Kojic, Y.H. Wen [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2010. – Vol. 51. – P. 6207-6219.
  14. 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.

## ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СЕТЧАТКЕ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГЛАЗА (ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ) С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ РЕТИНОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ МЕКСИДОЛА

*И.Л. Черешнюк<sup>1</sup>, Г.В. Загорій<sup>2</sup>, А.А. Ходаковський<sup>1</sup>*

**Резюме.** В представленной статье, на основе результатов собственных исследований, приведены некоторые патобиохимические механизмы, которые интегрируются в развитие экспериментального постреперфузионного ишемически-гипоксического поражения зрительного анализатора при переходящей 60-минутной ишемии-реперфузии глаза у крыс, а именно – место и роль энергодифицита, оксидативного стресса и нарушений обмена монооксида азота в формировании повреждений сетчатки. Проведена оценка наличия и степени выраженности корригирующего воздействия мексидола на указанные метаболические процессы при данной патологии. Установлено, что аноксия глаза в течение часа с последующей реперфузией отражает типичные внутриклеточные патофизиологические изменения, что указывает на репрезентативность данной модели для фармакологической оценки биологически активных веществ с ретинопротекторной активностью. Мексидол, благодаря своему модулирующему влиянию на метаболизм, может быть использован в качестве препарата сравнения.

**Ключевые слова:** мексидол, ретинопротекция, сетчатка, ишемия-реперфузия глаза.

## FEATURES OF METABOLISM IN THE RETINA OF RATS IN CONDITIONS OF ACUTE ISCHEMIA-REPERFUSION OF EYE (MODEL CHARACTERISTICS) ASSESSMENT AND PROPERTIES RETINOPROTECTION MEXIDOL

*I.L. Chereshniuk<sup>1</sup>, G.V. Zahorii<sup>2</sup>, O.A. Khodakovskiy<sup>1</sup>*

**Abstract.** The article is based on the results of our own research and describes some pathobiochemical mechanisms that get integrated into the development of experimental hypoxic-ischemic postreperfusion ischemically hypoxic injury of the visual analyzer in transient 60 minute ischemia- reperfusion of the rat's eye namely the place and role of fuel deficiency, oxidative stress and metabolism disturbance of nitrogen monoxide in formation of damaged retina. We estimated the presence and degree of expressiveness of mexidol corrective influence on these metabolic processes under conditions of this pathology. It was established that eye anoxia during an hour followed by reperfusion was accompanied by typical intracellular pathophysiological changes which made this model representative for pharmacological evaluation of biologically active substances with retinoprotective activity. Mexidol thanks to its modulating effect on metabolism may be used as the reference drug.

**Key words:** mexidol, retinoprotection, retina, ischemia-reperfusion of the eye.

<sup>1</sup>Pirohov National Medical University (Vinnytsia)

<sup>2</sup>Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education (Kyiv)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

д.мед.н. Я.І. Пенішкевич

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 193-197

Надійшла до редакції 10.09.2015 року