

УДК 617.21: 617.735: 617.731: 617.7-005.4: 576.35

І. Л. Черешнюк, В. Л. Пова, Г. В. Загорій, О. А. Ходаківський, О. А. Остра  
 Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, м. Вінниця,  
 Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ, ПрАТ  
 Фармацевтична фірма «Дарниця», м. Київ, Вінницький міський клінічний пологовий  
 будинок №1, м. Вінниця

## ВИКОРИСТАННЯ НЕЙРОМАРКЕРІВ (БЛОК S 100) ТА МЕТОДУ ПРОТОВОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ДЛЯ ПОРІВНЯЛЬНОЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ БЛОКАТОРІВ NMDA-РЕЦЕПТОРІВ НА НЕЙРОПРОЛІФЕРАТИВНІ ПРОЦЕСИ В СІТКІВЦІ ТА ЗОРОВОМУ НЕРВІ В УМОВАХ МОДЕЛЬНОЇ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ ОКА

Метою даної роботи було, використовуючи протоковий цитометричний аналіз та виміри активації нейромаркерів, дослідити зміни у процесах проліферації клітин сітківки і зорового нерву в постреперфузійний період гострої ішемії ока та оцінити ефективність блокувальних препаратів NMDA-рецепторів при даній патології. Подібне дослідження переслідує ціль не тільки впровадження нових методів для доклінічного вивчення препаратів нейротропного вектору фармакологічної активності, а й дасть змогу оцінити можливість використання вже відомих у неврологічній практиці препаратів за новим призначенням, а саме в якості нейроретинопротекторів.

В ході проведеного дослідження встановлено, що модельна 60 хв. ішемія-реперфузія ока в кінці першої доби спостереження характеризується вірогідним підвищенням відсоткового співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у суспензії в середньому у 7,46 разу при паралельному зростанні титру маркера нейрогліальної проліферації білка S 100 в середньому в 32,6 разу (7 доба). Порівняльна оцінка впливу досліджуваних блокувальних препаратів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока із використанням в якості нейромаркера зміни титру білка S 100 в комплексі з методом протокової цитометрії показала, що найбільш суттєвий вплив на окреслені процеси має адемом. Цей препарат вірогідно переважає мемантин та розчин магнію сульфату за даними ензиматичного дослідження, співставляючись з останнім препаратом за цитологічним показником проліферативної активності (інтенсифікація фази S клітинного циклу). Для дослідження величини та масштабу ішемічного ураження сітківки та зорового нерву доцільним та обґрунтованим є використання запропонованих методів та маркерів, а досліджувані блокувальні препарати NMDA-рецепторів є перспективними для клінічної оцінки за новим призначенням в якості нейроретинопротекторів.

**Ключові слова:** адемом, мемантин, манію сульфат, блокувальні препарати NMDA-рецепторів, нейроретинопротекція.

*Роботу є фрагментом НДР «Доклінічна оцінка ефективності потенційних органопротекторів» (№ держ. реєстрації 0115U007126).*

Останніми роками, поява на вітчизняному фармацевтичному ринку великої кількості нових метаболіто-тропних лікарських засобів із цитопротекторним впливом на нейрони (цитиколін, кортексин, корвітин, тіотриазолін, мексидол та ін. похідні янтарної кислоти) не знайшло очікуваного віддзеркалення у зменшенні показників інвалідизації хворих з нейроретинопатією, доводячи тим самим, що питання створення еталонного препарату із зазначеною дією ще далеко від свого остаточного вирішення [3].

Зміни метаболізму нейронів в умовах гострої редуції кровотоку в головному мозку та сітківці ока схожі і відбуваються стадійно, що дозволяє розробити інтегровані підходи до терапії цереброваскулярної патології та ретинопатій різного генезу [10]. Зокрема, глутаматна ексайтотоксичність, яка опосередкована надмірною активацією NMDA-рецепторів, і є ключовою ланкою у початку деструктивно-дегенеративних явищ при ішемічних ураженнях мозку та сітківки ока, являє собою потенційну мішень щодо можливих розробок напрямків патогенетичної терапії цих станів.

У літературі точаться чисельні дискусії стосовно можливої ефективності деяких похідних адамантану (наприклад мемантину), яким притаманна антагоністична дія на NMDA-рецептори при ішемічних ураженнях сітківки, однак опубліковані дані не узагальнені та містять суттєві протиріччя [3]. До перспективних ретинопротекторів з класу адамантанових похідних, теоретично можна віднести модулятор поліамінового сайту NMDA-рецепторів 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлорид – адемом (рис. 1), якому притаманний широкий спектр фармакологічних властивостей.

Результати попередніх досліджень свідчать про те, що адемом як і мемантин, володіє захисною дією на ішемізований головний мозок, яка реалізується за рахунок його модулювального впливу на активність NMDA-рецепторів [7]. При оцінці фармакологічних характеристик аспартат-активованих струмів на ізольованих пірамідних нейронах гіпокампу 15-денних білих щурів лінії Вістар WAG\GS було встановлено, що адемом є антагоністом/агоністом поліамінового сайту NMDA-рецепторів [4]. За рахунок цього він гальмує розвиток

нейродеструктивних процесів, опосередкованих глутаматною ексайтотоксичністю. Біологічно-активні речовини із подібним механізмом дії мають нейротрофічну складову та здатні підвищувати експресію молекул пам'яті CREB. Варто відмітити, що препарати із модульовальною дією на поліаміновий сайт NMDA-рецепторів не призводять до появи небажаних побічних ефектів з боку ЦНС, які притаманні повним блокаторам фенциклідинового сайту і проявляються у вигляді когнітивно-мнестичних розладів [6]. Наведені дані дають підстави сподіватись на можливе виявлення у адемолю захисної дії на сітківку та зоровий нерв в умовах їх ішемічного ураження.

Також перспективним у нейроретинотопротекції може бути використання іонів магнію (магнію сульфату) [2], які блокують канали NMDA-рецепторів потенціал-залежним способом, що захищає головний мозок при його ішемії.

**Метою** роботи було вивчення активності нейромаркерів, дослідити зміни у процесах проліферації клітин сітківки і зорового нерву в постреперфузійний період гострої ішемії ока, а також оцінити ефективність блокаторів NMDA-рецепторів при даній патології.

**Матеріал та методи дослідження.** Оцінку ступеня активації нейропроліферативних процесів в сітківці та зоровому нерві на тлі модельної ішемії-реперфузії (ІР) ока у досліджуваних блокаторів NMDA-рецепторів проведено на 61 щуру-самцю лінії Вістар масою 160-190 г. Усі тварини знаходились у віварії Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) імені М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні та вільному доступі до води та корму. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались методичних рекомендацій Державного фармакологічного 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» [11]. Дотримання біоетичних норм засвідчено комісією з біоетики ВНМУ імені М.І. Пирогова (висновок № 2 від 05.02.2015). Дослідження проводили в лабораторії кафедри фармакології по доклінічному вивченню фармакологічних речовин (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 023/13 від 05.03.2013 р.), у клініко-діагностичній лабораторії кафедри біохімії (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.) та 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.).

ІР ока моделювали шляхом накладання ретробульбарної лігатури щурам терміном 1 год. Через 60 хв. після ішемії, лігатури обережно розпускали і знімали. Кровобіг відновлювався самостійно. Стан очного дна контролювали за допомогою прямої офтальмоскопії (попередньо наносили на рогівку гель) через покривне скло, що використовується для виготовлення гістологічних препаратів [8].

В якості предмету досліджень у ролі модуляторів активності NMDA-рецепторів ми обрали мемантин («Мема» Актавіс-Україна, Україна) та розчин магнію сульфату («Магнія сульфат-Дарниця», Дарниця, Україна). Поряд із цим проводили порівняльну оцінку ефективності промислового зразка ампульного, 1,0 % розчину адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду («Адемо», Дарниця, Україна) для внутрішньовенних ін'єкцій.

Досліджувані лікарські засоби вводили однократно кожні 24 год в лікувальному режимі (термін терапії 1 та 7 діб) за умови першого застосування через 30 хв. після накладання ретробульбарної лігатури в умовно-ефективних дозах, які згідно даних літератури є достатніми для блокади NMDA-рецепторів нейронів головного мозку щурів. Для мемантину умовно-ефективна доза складає 20 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) [9], а для розчинів адамантану і магнію сульфату відповідно 2 мг/кг внутрішньоочеревинно (в/о) та 250 мг/кг внутрішньовенно (в/в) [2, 8]. Для в/ш введення мемантину через металічний орогастральний зонд (діаметр 22 G), готували його суспензію із твіном-80, розраховуючи концентрацію таким чином, щоб її загальний об'єм, який вводився в/ш, становив 2 мл/кг. Розчин магнію сульфату вводили в/в у попередньо катетеризовану (катетер, ERG 22 G, Польща) стегнову вену за допомогою інфузоматної системи упродовж перших 2 год з моменту накладання лігатури за методитою, розробленою О. А. Ходаківським [7]. Група контрольної патології (тварини з ІР без цитопротекторної терапії) отримувала 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/в. Групі псевдооперованих щурів накладали ретробульбарні лігатури без послідуєчого затягування. Будь-які травматичні маніпуляції та евтаназію тварин шляхом декапітації виконували в умовах прополового наркозу (60 мг/кг внутрішньоочеревинно, «Fresenius Kabi», Австрія).

Критеріями активації проліферативних процесів в сітківці було, перш за все, вірогідне зростання відносно групи контрольної патології рівня маркера активації нейроглії – титру білка S 100 у сироватці венозної крові на 7 день після моделювання патології, який визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням набору ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) [1]. Іншим критерієм цього процесу стало визначення особливостей клітинного циклу сітківки за допомогою методу протокової цитометрії, який дозволяє визначити відсоткове співвідношення клітин із проліферативною активністю, що перебувають у фазі синтезу ДНК (фаза S) до всіх клітин у дослідному зразку. Інтенсифікація проліферативної активності, зокрема поділ нейроглії, що окрім гіперензимії S 100 підтверджується підвищенням реплікаційної активності ДНК при цитометричному аналізі – є закономірною патоморфологічною відповіддю тканини на пошкодження клітин внаслідок некротичних або апоптотичних процесів [1, 8].

Для проведення цитометричних досліджень через 7 діб після реперфузії виконували енуклеацію. Очні яблука щурів позбавляли залишок кон'юнктиви та м'язів і за допомогою мікрохірургічного інструментарію видалявся передній відділ ока і кришталик. Залишки очного яблука розправлялись таким чином, щоб до огляду було доступне очне дно. Парапапілярно за допомогою мікрохірургічного трепана діаметром 2 мм помічались і видалялись ділянки сітківки.

Вміст ДНК в ядрах клітин сітківки щурів визначався методом протокової цитометрії [5]. Суспензії ядер з клітин сітківки отримували за допомогою наборів для дослідження ядерної ДНК, відповідно, CyStain DNA Step 1 (Partec, Німеччина) до складу яких входить діамідинофенілндол (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Протоковий аналіз виконували на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовували ультрафіолетове випромінювання. Якість промаркованих ядерних суспензій перевіряли за допомогою флуоресцентного мікроскопу ЛЮМАМ Р-8 (ЛЮМО, СРСР) (ультрафіолетове збудження), цифрової камери TView (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 + М – відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G2 + М клітинного циклу із вмістом ДНК = 4с до їх загальної дослідної кількості.

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. Аналіз ДНК гістограм виконували засобами програмного забезпечення проточного цитометру FloMax (Partec, Німеччина). Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Вже наприкінці першої доби постреперфузійного періоду експерименту, відмічається зростання проліферативної активності ретинальних клітин (у тому числі і за рахунок нейрогліальних). На користь подібного твердження вказує вірогідне підвищення в середньому у 7,46 разу відсоткового співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у суспензії (табл. 1). Згідно літературних даних [8] досліджуваний показник є відповіддю сполучної тканини на альтераційний процес. Тобто, інтенсифікація фази S клітинного циклу характеризує початок заміщення зруйнованих клітин сітківки, зокрема нейрональних на сполучнотканинні (нейрогліальні) елементи.

Оцінка на 7 добу експерименту титру білка S 100 в сироватці крові щурів групи контрольної патології показала, що модельна ІР ока супроводжується вірогідною ескалацією рівня досліджуваного ензиму відносно псевдооперованих тварин в середньому в 32,6 разу (табл. 2). Отримані дані, опосередковано вказують про значне некротичне ураження шарів сітківки та клітин зорового нерву, а також безпосередньо свідчать про заміщення цих клітин нейроглією за рахунок інтенсивного поділу астроглії. Таким чином, обидва досліджуваних показники у різні періоди постреперфузійного періоду співвідносяться із інтенсивністю ішемічного ураження.

Застосування мемантину терапевтично-ефективною дозою 20 мг/кг в/ш перешкоджало ескалації рівня білка S 100 відносно фонових значень (табл. 2). Так його рівень був нижчим порівняно з титрами у тварин групи контрольної патології в середньому в 2,88 разу ( $p < 0,05$ ).

Цьому передували певні зміни у відсоткову співвідношенні клітин сітківки, що перебувають у різних фазах клітинного циклу. Наприкінці першої доби, після однократного введення мемантину кількість клітин у фазі S була вірогідно меншою порівняно з контролем в середньому в 1,5 рази, що вказує про низьку активацію проліферативних процесів в цій групі, а значить і меншу (порівняно із модельною патологією) альтерацію клітин сітківки та зорового нерву (табл. 1). Дещо менше порівняно із мемантином (однак не вірогідне) підвищення титру білка S 100 відносно вихідного рівня після моделювання перехідної ішемії ока відмічалось на тлі внутрішньовенного застосування розчину сульфату магнію (табл. 2).

Таблиця 1

**Вплив мемантину, розчинів магнію сульфату та адемолу на активність проліферативної фази S клітин сітківки щурів після ішемії-реперфузії ока на 24 год експерименту, M±6**

Умови досліджу	Відносна кількість клітин (у %), що перебувають у фазі S
Псевдооперовані щури, n=7	0,13±0,01
IP + 0,9% р-н NaCl, n=7, (контрольна патологія)	0,97±0,15*
IP + мемантин, 20 мг/кг в/ш, (n=7)	0,63±0,12*#
IP + магнію сульфат, 250 мг/кг в/в, (n=7)	0,40±0,05*#^
IP + адемола, 2 мг/кг в/в, (n=10)	0,38±0,05*#^

Примітки: IP – ішемія-реперфузія; в/ш – внутрішньошлунково; в/о – внутрішньоочеревинно; в/в – внутрішньовенно; \* – p<0,05 відносно псевдооперованих щурів; # – p<0,05 відносно контрольної патології; ^ – p<0,05 відносно мемантину.

Таблиця 2

**Вплив мемантину, розчинів магнію сульфату та адемолу на рівень білка S 100 у крові щурів на 7 добу терапії модельної ішемії-реперфузії ока, M±m**

Дослідні групи	Рівень білка S 100 (нг/мл)
Псевдооперовані щури, (фоновий рівень), n=5	0,452±0,014
IP + 0,9% р-н NaCl, (контрольна патологія), n=5	14,748±0,829*
IP + мемантин, 20 мг/кг в/ш, (n=5)	5,122±0,065*#
IP + магнію сульфат, 250 мг/кг в/в, (n=5)	4,564±0,359*#
IP + адемола, 2 мг/кг в/о, (n=10)	2,596±0,169*#^o

Примітки: IP – ішемія-реперфузія; в/ш – внутрішньошлунково; в/о – внутрішньоочеревинно; в/в – внутрішньовенно. \* – p<0,05 відносно псевдооперованих щурів; # – p<0,05 відносно контрольної патології; ^ – p<0,05 відносно мемантину; o – p<0,05 відносно магнію сульфату.

Його рівень на 7 добу терапії був вірогідно нижчим за показники в групі контрольної патології в середньому у 3,23 рази, що є лише в середньому на 11,0 % нижчим за титри у щурів з пероральним застосуванням амантадину (p>0,05). На противагу цьому, вже на тлі першого введення розчину магnezії відмічалось пригнічення проліферативної активності, яке було не тільки вірогідно меншим ніж у групі контрольної патології ( в середньому у 2,43 рази), а й переважало у 1, 58 разу за своєю ефективністю терапію мемантином (p<0,05) (табл. 1). Таким чином, парантеральне застосування каналного блокатора NMDA-рецепторів, певним чином, переважає за нейроретиноцитопротекторною активністю пероральний прийом блокатора фенциклідинового сайту аналогічного рецепторно-іонофорного комплексу.

Найбільш виразні, достовірно ліпші за величиною цитопротекторні та антипроліферативні властивості, як у гострий постреканалізаційний період, так і на 7 добу експерименту, продемонстрував модулятор поліамінового сайту NMDA-рецепторів адемола. На завершальному етапі спостереження на тлі щоденного курсового застосування адемола, титр нейромаркера білка S 100 був вірогідно меншим не тільки по відношенню до тварин без фармакотерапії, а й відносно щурів, яким окремо вводили мемантин, або розчин магнію сульфату в середньому відповідно у 5,68, 1,97 та 1,76 разу відповідно (табл. 2).

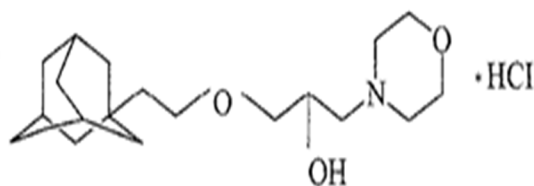


Рис. 1 Хімічна структура адамантилетиокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола).

Аналогічну за силою та вектором напрямку антипроліферативної активності продемонстрував адемола і на початку експерименту, що проявилось вже після його першого введення: кількість клітин у фазі S клітинного циклу було вірогідно меншою відносно контролю в середньому у 2,56, а відносно мемантину майже удвічі, співставляючись за цим показником із розчином магнію сульфату (табл. 1).

Таким чином, порівняльна оцінка впливу досліджуваних блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока. Яка використовується в якості нейромаркера зміни титру білка S 100 в комплексі з методом протокової цитометрії показала, що найбільш суттєвий вплив на окреслені процеси має адемола, який вірогідно переважає мемантин та розчин магнію сульфату за ензиматичним тестом, співставляючись з останнім препаратом за цитологічним показником проліферативної активності визначеному за інтенсифікацією фази S клітинного циклу.

### Висновки

1. За спроможністю зменшувати відсоткове співвідношення клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у клітинній суспензії сітківки через 24 год після 60 хв. ішемії-реперфузії ока, досліджувані препарати можна розташувати у такій послідовності: адемола  $\geq$  магнію сульфат  $>$  мемантин.
2. За спроможністю зменшувати титр маркера, що відображає активність нейроглії у постреперфузійний період на 7 добу ретинальної ішемії лінійка досліджуваних блокаторів активності NMDA-рецепторів виглядає наступним чином: адемола  $>$  магнію сульфат  $\geq$  мемантин.

*Перспективи подальших досліджень.* У подальшому перспективним є поглиблене вивчення механізмів нейроретинопротекторної активності адемоли, магнію сульфату та мемантину з метою обґрунтування можливості впровадження їх у практичну офтальмологію.

### Список літератури

1. Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черный, Ю. М. Колесник [и др.] // Донецк: Издатель Заславский А.Ю., – 2009. – 262 с.
2. Багаурі О. В. Експериментальна оцінка впливу похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу (сполука R-86) на динаміку процесів нейродеструкції при гострій церебральній ішемії / О. В. Багаурі // Український вісник психоневрології. – 2014. – № 2 (79). – С. 22–25.
3. Сердюк В. М. Клініко-експериментальне обґрунтування нейропротекції в комплексі лікування хворих на первинну відкритокутову глаукому: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук / В. М. Сердюк – Одеса., - 2015. – 36 с.
4. Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка впливу похідних адамантану сполук ЮК-1 та ЮК-4 на активність NMDA-рецепторів / О. А. Ходаківський // Клінічна фармація. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 60-63.
5. Ходаківський О. А. Дослідження впливу похідного адамантану адемола на фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток кори за ішемії-реперфузії головного мозку у щурів / О. А. Ходаківський, І. Л. Черешнюк // Український вісник психоневрології. – 2013. – Т. 21, вип. 1(74). – С. 26-28.
6. Ходаківський О.А. Характеристика протиішемічних та мнемотропних властивостей адемола при модельному гострому порушенні мозкового кровообігу / О. А. Ходаківський // Фізіологічний журнал. – 2013, Т. 59, № 5. – С. 71-77.
7. Ходаківський О. А. Патогенетичне обґрунтування доцільності використання нових похідних адамантану при експериментальній терапії гострої ішемії головного мозку та міокарда: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук / О. А. Ходаківський. – Одеса., - 2014. – 32 с.
8. 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.
9. Belda X. Acute stress induced sensitization of the pituitary–adrenal response to heterotypic stressors: Independence of glucocorticoid release and activation of CRH1 receptors / X. Belda, N. Daviu, R. Nadal [et al.] // Hormones and Behavior. – 2012. – Vol. 62, № 4. – P. 515-524.
10. Osborne N. N. 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, № 3. – P. 331-342.
11. 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.

### Реферати

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙРОМАРКЕРОВ (БЕЛОК S 100) И МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ БЛОКАТОРОВ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ НА НЕЙРОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СЕТЧАТКЕ И ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ ПРИ МОДЕЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГЛАЗА**

Черешнюк И.Л., Повх В.Л., Загорий Г.В., Ходаковский А.А., Остра Е.А.

Целью данной работы является, используя проточный цитометрический анализ и измерение активности нейромаркеров, исследовать изменения в процессах пролиферации клеток сетчатки и зрительного нерва в постреперфузионный период острой ишемии глаза и оценить эффективность блокаторов NMDA-рецепторов при данной патологии. Подобное исследование преследует цель не только

**USAGE OF NEUROMARKER (S100 PROTEIN) AND FLOW CYTOMETRY FOR COMPARATIVE ASSESSMENT OF NMDA-RECEPTOR ANTAGONISTS' EFFECT ON NEUROPROLIFERATIVE PROCESSES IN RETINA AND OPTIC NERVE IN CASE OF MODELLED OPHTHALMIC ISCHEMIA-REPERFUSION**  
Chereshnyuk I.L., Povkh V.L., Zagorii G.V., Khodakovskiy A.A., Ostra E.A.

The purpose of the study is to investigate the changes of the proliferative processes cells in retina and optic nerve during postreperfusional period of acute ocular ischemia using the flow cytometric analysis and measurement of neuromarker activity, and to assess the efficacy of NMDA receptor antagonists in case of mentioned pathology. Such investigation aims not only the implementation of the new

внедрение новых методов для доклинического изучения препаратов нейротропного вектора фармакологической активности, но и позволит оценить возможность использования уже известных в неврологической практике препаратов по новому назначению, а именно в качестве нейроретинопротекторов. В ходе проведенного исследования установлено, что модельная 60 мин. ишемия-реперфузия глаза в конце первых суток наблюдения характеризуется вероятным повышением процентного соотношения клеток в фазе синтеза ДНК (фаза S) к их общему количеству в суспензии в среднем в 7,46 раза. При этом последовательно возрастает титр маркера нейроглиальной пролиферации (белок S 100) в среднем в 32,6 раза (7 сутки). Сравнительная оценка влияния блокаторов NMDA-рецепторов на нейропролиферативные процессы в сетчатке и зрительном нерве при модельной ишемии-реперфузии глаза с использованием в качестве нейромаркера изменения титра белка S 100, в комплексе с методом проточной цитометрии показала, что наиболее существенное влияние на указанные процессы имеет адемомол. Данный препарат достоверно превосходит мемантин и раствор магния сульфата по данным энзиматического теста, сопоставляясь с последним за цитологическим показателем пролиферативной активности (интенсификация фазы S клеточного цикла). Для исследования величины и масштаба ишемического поражения сетчатки и зрительного нерва целесообразным и обоснованным является использование предложенных методов, а исследуемые блокаторы NMDA-рецепторов являются перспективными для клинической оценки по новому назначению в качестве нейроретинопротекторов.

**Ключевые слова:** адемомол, мемантин, магия сульфат, блокаторы NMDA-рецепторов, нейроретинопротекция.

Стаття надійшла 2.03.2016 р.

methods for pre-clinical research of drugs with neurotropic vector of pharmacological activity, but allows assessment of the possibility for already known drugs used in neurological practice to be applied for the new indication, particularly as neuroretinoprotectors. In the course of research we determined the significant increase of percentage ratio of the cells in DNA synthetic phase (phase S) to their total amount in the tissue suspension for a median of 7,46 times in the modelled 60 minute ophthalmic ischemia-reperfusion at the end of the first day of observation. This is followed by the increase of neuroglial proliferation marker (S100 protein) titer for a median of 32,6 times (7th day). Comparative assessment of the NMDA receptor antagonists' effect on neuroproliferative processes in retina and optic nerve in case of modelled ophthalmic ischemia-reperfusion using the change of S100 protein titer as neuromarker, together with the flow cytometry method, showed that the most significant effect on the mentioned processes was expressed by ademol. The data of enzymatic test show that this drug has significant advantage of memantine and magnesium sulfate solution, and correlates with the last mentioned by the cytological index of proliferative activity (intensification of S-phase of cell cycle). It is reasonable and rational to use the proposed methods and markers for the assessment of the value and grade of ischemic injury retina and optic nerve, and the investigation of NMDA receptor antagonists is prospective for clinical assessment using the new indication - as neuroretinoprotectors.

**Key words:** ademol, memantine, magnesium sulfate, NMDA receptor antagonists, neuroretinoprotection.

Рецензент Запорожець Т.М.