

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

**ПОВХ ВЯЧЕСЛАВ ЛЕОНІДОВИЧ**

УДК: 615.216.8:617.7-001.3-005.4

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

14.01.32 – медична біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

**Вінниця – 2018**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**Ходаківський Олексій Анатолійович**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, професор кафедри фармакології, завідувач навчально-науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки лікарських засобів та біологічно-активних сполук «Фармадар».

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Мхітарян Лаура Сократівна**, Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя МОН України, завідувач науково-навчальної лабораторії з біохімічних та медико-валеологічних досліджень;

доктор медичних наук, професор  
**Ніженковська Ірина Володимирівна**, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії.

Захист відбудеться «11» січня 2019 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 при Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий «30» листопада 2018 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 05.600.05  
кандидат медичних наук

О. А. Назарчук

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Глутаматна ексайтотоксичність, асоційована з надмірною активацією NMDA-рецепторів, відіграє провідну роль в ураженні зорового аналізатора при ішемії, глаукомі [Ullian E.M., 2004], вторинній альтерації сітківки на тлі хірургічних втручань [Calzada J.I., 2002; Ito Y., 2010]. Підвищення рівня глутамату та гіперактивація NMDA-рецепторів викликає ураження гангліонарних клітин сітківки внаслідок ініціації оксидативного стресу, апоптозу, запальної реакції [Lam T.T., 1999; Kim J.H., 2007; Miao Y., 2012]. В окремих роботах засвідчено, що інгібітор NMDA-рецепторів мемантин справляє нейропротективний ефект при експериментальному ураженні сітківки ока [WoldeMussie E., 2002; Abdel-Hamid A.A., 2016]. Між тим, модуляція активності NMDA-рецепторів при ураженні зорового аналізатора може мати і інший вектор. Адже NMDA-рецептори залучені до регуляції постсинаптичної активності під час регенерації зорового нерва, а їх блокування викликає пригнічення спонтанної постсинаптичної активності фоторецепторів [Kolls B.J., 2013]. Тому більш детальне дослідження впливу модулаторів NMDA-рецепторів з різним механізмом дії на показники нейроретинодеструкції за експериментального ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора є доцільним.

Чутливими та специфічними маркерами альтерації нейронів ішемічного та травматичного генезу є зростання сироваткових рівнів NSE [Haque A., 2016; Lorente L., 2017] та білку S100 [Thelin E.P., 2013; Lorente L., 2017]. NSE експресується в нейронах, астроцитах, олігодендроцитах, регулює нейрональну та гліальну активність і за високих концентрацій може стимулювати експресію прозапальних цитокінів, індукувати апоптоз [Haque A., 2016]. NSE експресується в нейронах сітківки, пігментному епітелії та фоторецепторних клітинах [Fujieda H., 1994], виявляється в екстрацелюлярному «міжфоторецепторному» матриксі [Li A., 1995], але питання щодо змін вказаного маркера в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора не з'ясовано. Білок S100 експресується в гліальних клітинах, переважно астроцитах, належить до кальцій-, мідь- та цинк-зв'язуючих білків [Kawata K., 2016], залучений до  $Ca^{2+}$ -залежної активації гуанілатциклази (в тому числі і в клітинах сітківки ока) [Duda T., 2012; Wen X.H., 2012], дофамінового сигналіngu через взаємодію з D2-рецепторами дофаміну [Liu Y., 2008]. За низьких концентрацій білок S100 виявляє трофічний потенціал, а за високих - проапоптичну, прозапальну та нейродегенеративну дію [Kawata K., 2016]. Між тим, питання щодо змін рівня NSE та білка S100 в сироватці крові при ураженні зорового аналізатора різної етіології та при введенні модулаторів NMDA-рецепторів не визначено.

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

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в рамках спільної планової НДР Науково-дослідного центру, Навчально-

науково-дослідної лабораторії «Фармадар», кафедри фармакології, біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів», № держреєстрації 00115U007126; НДР кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті», № держреєстрації 0112U0021939.

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

**Завдання дослідження:**

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

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

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

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

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

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

*Предмет дослідження:* вплив модуляторів NMDA-рецепторів на маркери нейродеструкції (рівень нейронспецифічної енолази, білка S100), цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопрولیферативної активності сітківки, метаболічні зміни в тканинах ока, показники мікроциркуляції при ішемічному та травматичному ушкодженні зорового аналізатора.

*Методи дослідження:* біохімічні, імуноферментні, функціональні, метод протокової цитометрії, фармакологічні, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Визначена роль фармакологічних модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ураження зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу в досліді in

vivo. Експериментально обґрунтована доцільність корекції нейроретино-деструктивних змін за ішемії/ реперфузії ока та контузійної травми ока за допомогою інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату та інгібітора фенциклідинового сайту мемантину, засвідчена менша ефективність блокатору іонного каналу магнію сульфату.

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

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

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

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

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

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

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

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 16 наукових праць, в тому числі 1 стаття у зарубіжному виданні, 7 статей у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України (2 одноосібних; 5 включено до міжнародних наукометричних баз), 6 - в збірках, матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патенти України на корисні моделі.

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

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** В цьому розділі описані сучасні уявлення про біохімічні механізми ушкодження нейронів гангліозного шару сітківки за умов патології зорового аналізатору різного генезу. Розглянуті перспективні напрямки нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного пошкодження ока, а також

можливості застосування модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів при ретинодеструктивних ушкодженнях зорового аналізатору.

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

На щурах моделювали ішемію / реперфузію ока, а на кролях відтворювали модель травматичного ураження зорового аналізатора.

Модель гострої ішемії / реперфузії ока із постреперфузійним ураженням сітківки у щурів. Для відтворення ішемії сітківки ока використовували модель одnobічної ішемії-реперфузії (IP) в басейні а. ophthalmica у щурів. IP створювали шляхом накладання ретробульбарної лігатури на ліве око щура терміном на 1 годину. Для створення тотальної ішемії ока ретробульбарні лігатури затягували до зникнення кровотоку в судинах сітківки і фіксували зажимами. Через 60 хв. після ішемії, ретробульбарні лігатури обережно розпускали і знімали. Контролем слугувала група псевдооперованих щурів, яким накладали ретробульбарні лігатури без наступного затягування. На моделі IP у щурів оцінювали можливі нейроретинопротекторні ефекти модуляторів NMDA-рецепторів при постреперфузійному ураженні сітківки. В якості фармакологічних модуляторів NMDA-рецепторів були застосовані - блокатор поліамінового сайту амантадин, блокатор фенциклідинового сайту мемантин, блокатор іонного каналу магнію сульфат. Вказані засоби вводили тваринам через 30 хв. після накладання ретробульбарної лігатури на а. ophthalmica 1 раз на добу. Введення препаратів проводили у дозах, які за даними літератури є достатніми для блокади NMDA-рецепторів у щурів при різних патологічних процесах у мозку. Для мемантину ця доза складає 20 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) [Lagrèze W.A., 1998], для амантадину сульфату – 5 мг/кг внутрішньовенно (в/в) [Жабоедова Н.В., 2016], для магнію сульфату – 250 мг/кг в/в [Жабоедова Н.В., 2016]. Згідно рекомендацій по доклінічній оцінці препаратів, або біологічно-активних сполук із цито- та органопротекторною активністю при скринінгу умовно-ефективної дози їх доцільно додатково вивчити у більш широкому перерахунку доз за рахунок зменшення та підвищення удвічі тої дози, на тлі застосування якої перший раз при скринінгу зареєстровано найбільш виразну проєктивну активність [Беленичев І. Ф., и др., 2009]. Тому, мемантин додатково досліджували дозами 10 мг/кг та 40 мг/кг в/ш, а розчини амантадину і магнію сульфату відповідно дозами 2,5 і 10 та 150 і 350 мг/кг в/в. Група контрольної патології (тварини з IP без цитопротекторної терапії) отримувала 0,9 % розчин NaCl із розрахунку 2 мл/кг в/в. Різниця між

дизайном терапії при скринінгу та оцінці лікувального ефекту полягала в тому, що у першому випадку біологічний матеріал (кров, сітківка) забирали через 24 год, а у другому випадку - на 7-му добу терапії.

Модель травматичного ураження зорового аналізаторів у кролів.

Експериментальну контузію ока у кролів, викликану дією потоку вуглекислого газу під тиском, створювали із використанням газобалонного пневматичного пістолету марки «Байкал МР-654К» (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) з використанням балонів вуглекислого газу (маса зрідженого CO<sub>2</sub> – 12 г) під тиском (Crosman, США, № серії 456739). На цій моделі у кролів оцінювали можливі нейроретинопротекторні ефекти амантадину та мемантину. Магній сульфат був виключений з дизайну дослідження, адже викликав зниження внутрішньоочного тиску, що є небажаним при травматичному ураженні ока. Вказані модулятори вводили у тиж же дозах, що й на моделі ІР. Перше введення досліджуваних препаратів здійснювали через 60 хв. після травми з інтервалом у 12 год. Як і на моделі ІР, у частини дослідних груп терапія тривала добу, а у іншій - 7 діб, залежно від мети експериментів. Водорозчинні препарати вводили в/в у крайову вену вуха.

Біохімічні дослідження проведені в сироватці крові та гомогенаті сітківки ока. В сироватці крові визначали вміст маркера нейродеструкції - нейронспецифічної енолази (NSE; КФ 4.2.1.11) методом імуноферментного аналізу за набором «NSE ELISA KIT» (DAI, США) та білка S 100 за набором «S 100 ELISA KIT» (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція). В гомогенатах сітківки ока визначали вміст малонового діальдегіду (МДА) за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Владимиров Ю. В., Арчаков А. И., 1972], карбонільних груп протеїнів (КГП) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [Заїчко Н.В., 2003]. Рівень загального білка визначали мікробіуретовим методом [Кочетов Г.А., 1980]. Активність глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9) визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненого глутатіону [Власова С. Н., Шабуніна Е. И., Персlegина И. А., 1990]. Сумарний вміст нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависю цинкового порошку в розчині амоніаку [Коренман И.М., 1975]. Вміст аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) визначали у свіжовиготовленому безбілковому трихлороцтовому екстракті сітківки 1:10 (10% розчин трихлороцтової кислоти) методом тонкошарової хроматографії [Прохорова М. И., 1972]. Вміст глутамату визначали методом тонкошарової хроматографії [Попова Л. Д., 2007].

Дослідження мікроциркуляції заднього полюса ока у щурів та кролів проводили за допомогою лазер-доплерографічного модуля ВІОРАК (США).

Дослідження вмісту ДНК в ядрах клітин сітківки методом протокової ДНК-цитометрії. Вміст ДНК в ядрах клітин сітківки визначали методом протокової цитометрії на багатофункціональному науково-дослідному однойменному цитометрі «Partec PAS» (Partec, Німеччина). Визначали наступні показники: G0G1 – відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі G0G1 клітинного циклу із вмістом ДНК = 2с (с – content – «вміст») до їх загальної дослідної кількості; S – відсоткове співвідношення ядер, які перебувають у фазі синтезу ДНК із її вмістом > 2с та < 4с до їх загальної дослідної кількості; визначення фрагментації ДНК (апоптоз), виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах



RN1 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою універсальних статистичних програм MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Визначали середнє значення, стандартні помилки. Для оцінки відмінностей показників застосовували при нормальному розподілі - параметричний t-критерій Ст'юдента, при відхиленні від нормального розподілу - непараметричні критерії U Мана-Уїтні та Краскела-Уолліса, нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірманом. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ . Результати наведено як  $M \pm m$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дослідження впливу модуляторів NMDA-рецепторів на показники нейроретинодеструкції (рівень NSE, білка S100 та цитометричні маркери) за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора. Експериментальне ішемічне ураження зорового аналізатору у щурів асоціюється з підвищенням маркерів нейродеструкції (табл. 1) в сироватці крові - NSE (на 1-шу та 7-му в 10,9 та 4,3 рази,  $p < 0,001$ ) та білка S100 (на 1-шу та 7-му добу - в 8,4 та 14,7 рази,  $p < 0,001$ ).

Таблиця 1 - Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на рівень NSE та білка S100 в сироватці крові щурів з моделлю IP ока ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Дослідні групи щурів		NSE, нг/мл	Білок S100, нг/мл
1	Псевдооперовані щури	0,31±0,013	0,45±0,01
2	IP + 0,9% NaCl (контрольна патологія)	3,52±0,15*	14,78±0,83*
3	IP + мемантин	1,27±0,04 <sup>*#^</sup>	5,12±0,07 <sup>*#</sup>
4	IP + амантадину сульфат	0,58±0,06 <sup>*#^</sup>	1,13±0,04 <sup>*#^</sup>
5	IP + магнію сульфат	1,20±0,12 <sup>*#^</sup>	4,56±0,36 <sup>*#€</sup>

Примітки:

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

Застосування в умовах модельної IP ока блокаторів NMDA-рецепторів (мемантину, амантадину сульфату, магнію сульфату) в умовно ефективних дозах забезпечувало деескалацію біохімічних маркерів нейродеструкції, однак ступінь зниження показників суттєво відрізнявся. Так, при введенні мемантину в дозі 20 мг/кг відмічалось зниженням рівнів NSE та білка S100 в сироватці крові відповідно в 2,77 та 2,88 рази відносно групи контрольної патології. Застосування магнію сульфату у дозі 250 мг/кг викликало деескалацію цих показників відповідно в 2,93 та 3,24 рази. Найбільший нейроретинопротекторний ефект спостерігався при застосуванні амантадину сульфату у дозі 5 мг/кг - зниження сироваткового рівня NSE та білка S100 становило відповідно 6,07 та 13,1 рази.

Додаткові докази закономірностей, виявлених при біохімічному дослідженні, були отримані на підставі аналізу результатів протокової ДНК-цитометрії клітин

сітківки. Результати наших досліджень засвідчили, що вже наприкінці першої доби постреперфузійного періоду спостерігалось підвищення кількості ретинальних клітин з ознаками апоптозу та наростала проліферативна активність ретинальних клітин (табл. 2).

Таблиця 2 - Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на показники клітинного циклу в сітківці щурів з моделлю ІР ока ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

Дослідні групи щурів		Показники клітинного циклу (%)	
		SUB-G0G1	S
1	Псевдооперовані щурі	0,49±0,06	0,13±0,01
2	ІР + 0,9% NaCl (контрольна патологія)	9,91±1,44*	0,97±0,15*
3	ІР + мемантин	6,11±0,61* <sup>#</sup>	0,63±0,12* <sup>#</sup>
4	ІР + амантадину сульфат	2,93±0,14* <sup>#^</sup>	0,32±0,07* <sup>#^</sup>
5	ІР + магнію сульфат	3,86±0,43* <sup>#^€</sup>	0,40±0,05* <sup>#</sup>

Примітки:

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

У щурів з моделлю ІР ока через 24 години відсоток клітин в фазі SUB-G0G1 був достовірно вищим в 20-21 рази, ніж у інтактних та псевдооперованих щурів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=3,13$ ,  $p=0,001$ ). За цих умов відсоток клітин в фазі S достовірно перевищував показники інтактних та псевдооперованих щурів у 7 - 8 разів (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=2,87$ ,  $p=0,002$ ). Станом на 7-му добу у щурів з ІР ока частка клітин в фазі SUB-G0G1 була нижчою в 1,37 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=1,08$ ,  $p=0,31$ ), але залишалась значимо вищою (в 14,8 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=3,13$ ,  $p=0,001$ ). Подібні зміни відмічались і з показником проліферативної активності: частка клітин в фазі S була нижчою в 1,15 рази, ніж на 1-шу добу (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=1,34$ ,  $p=0,209$ ), але залишалась значимо вищою (в 6,0 рази), ніж в групі псевдооперованих тварин (критерій Мана-Уїтні, стандартизований  $U=3,13$ ,  $p=0,001$ ).

Усі досліджувані блокатори NMDA-рецепторів у застосованих дозах сприяли зменшенню відносної кількості ретиноцитів, які перебувають у фазах SUB-G0G1 та S клітинного циклу, однак ступінь зниження даного показника істотно відрізнявся залежно від застосованого препарату. Реалізацію найбільш потужного антиапоптотичного та антипроліферативного ефекту на клітини сітківки забезпечувало застосування амантадину сульфату дозою 5 мг/кг – його введення супроводжувалось зменшенням кількості клітин у фазах SUB-G0G1 та S відповідно в 3,03 та 3,38 разів відносно групи контрольної патології. Застосування магнію сульфату (250 мг/кг в/в) призводило до зменшення відсотку клітин, які перебувають у фазах SUB-G0G1 та S, відносно цього ж показника групи контрольної патології, відповідно в 2,57 та 2,42 рази, тоді як введення мемантину

(20 мг/кг в/шл) супроводжувалось зниженням цих показників лише в 1,62 та 1,54 рази.

В подальшому ми оцінили нейроретинопротекторний потенціал модуляторів NMDA-рецепторів за травматичного ушкодження зорового аналізатора на моделі стандартизованої контузії ока у кролів. Оскільки в експерименті магній сульфат (250 мг/кг в/в) викликав вірогідне зменшення внутрішньоочного тиску (ВОТ) у інтактних щурів (є небажаним при травмі ока), тому цей препарат був вилучений із дизайну дослідження.

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

В подальшому на моделі травми ока був оцінений вплив амантадину та мемантину на показники клітинного циклу (рис. 1).

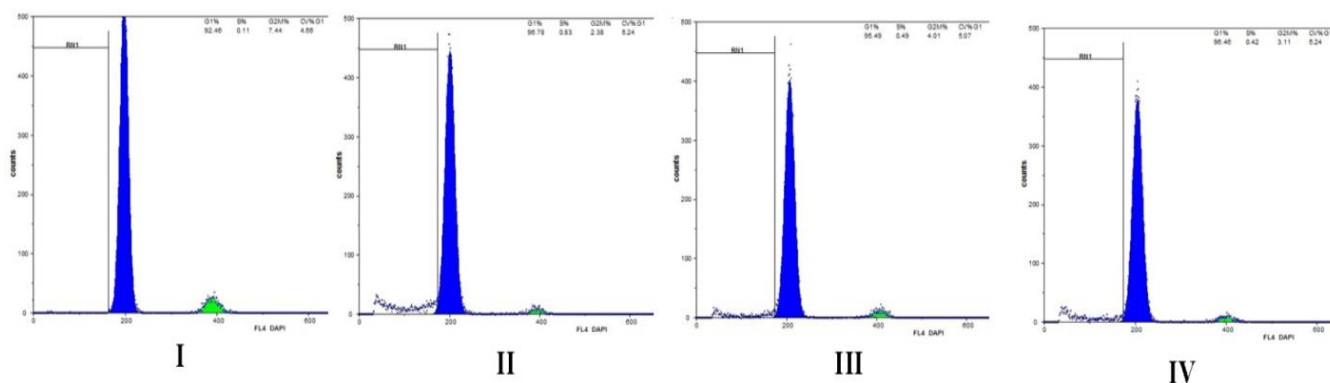


Рисунок 1 - Приклад ДНК-гістограм ядерної суспензії клітин сітківки інтактного кроля (I) та кролів із контузією ока, які отримували: II – 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія), III – розчин амантадину сульфату та IV – мемантин.

Виявилось, що за умов контузії ока у кролів частки клітин сітківки у фазі SUB-G0G1 та у фазі S були вищими в 14,6 та 4,41 рази станом на 1-шу добу; в 10,0 та 7,70 разів - на 7-му добу ( $p < 0,001$ ). Застосування блокаторів NMDA-рецепторів супроводжувалось зменшенням активності процесів нейроретиноапоптозу та

нейрогліопроліферації, однак виразність цього ефекту була вищою у амантадину, порівняно з мемантином. Так, при застосуванні мемантину у дозі 20 мг/кг в/шл у тварин з контузією ока через 24 години відсоток клітин із ознаками фрагментації ДНК (у фазі SUB-G0G1) та ознаками реплікації ДНК (у фазі S) був достовірно нижчим відповідно на 25,1 та 25,3 %, ніж в групі контрольної патології. Введення амантадину сульфату в дозах 2,5 мг/кг та 5 мг/кг в/в у кролів з модельною контузією ока забезпечувало зниження частки клітин у фазі SUB-G0G1 на 51,1 % та 60,3 %, а у фазі S на 44,0 % та 58,7 % відносно кролів групи контрольної патології.

*Дослідження впливу модуляторів NMDA-рецепторів на мікроциркуляцію ока за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора (табл. 3).* Виявилось, що на тлі ішемії ока відмічалось зниження коефіцієнта мікроциркуляції (КМ) в 39,2 рази, відносно фонового рівня. В постреканалізаційному періоді також реєструється суттєва гіперперфузія (КМ виявився достовірно меншим порівняно із його фоновим значенням у середньому в 3,3 рази), що свідчить про формування синдрому невідновленого кровоплину. Поряд з цим за умов травматичного ураження зорового аналізатора також відмічається сповільнення кровотоку в судинах ока, про що свідчить значне зниження коефіцієнта мікроциркуляції відносно фонових значень в середньому в 8,2 рази. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази,  $p < 0,05$ ) мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді із максимальним ефектом у амантадину сульфату (5 мг/кг в/в).

Таблиця 3 - Вплив мемантину, амантадину, магнію сульфату на коефіцієнт мікроциркуляції (у.о.) в судинах заднього полюсу ока у щурів ( $n=7$ ) після реперфузії а. *ophthalmica* та у кролів ( $n=10$ ) в постконтузійний період ( $M \pm m$ )

Дослідні групи щурів		ІР ока у щурів			Контузія ока у кролів	
		Фон	Ішемія	Реперфузія	Фон	Травма
1	ІР / контузія ока + 0,9% NaCl (контрольна патологія)	8694± 39,3	221,9± 5,4*	2665± 68,8*	11396± 218,6	1398± 35,0*
2	ІР / контузія ока + мемантин	8698± 43,4	234,1± 6,3*	4355± 77,9*#	10706± 125,0	6344± 130,4*#
3	ІР / контузія ока + амантадину сульфат	8721± 39,2	226,3± 3,2*	6738± 40,1*#^	10990± 109,5	8868± 128,9*#^
4	ІР / контузія ока + магнію сульфат	8836± 31,4	239,6± 4,4*	44676± 51,2*#€	10987± 107,6	9802± 118,6*#^€

Примітки:

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

Отже, модулятори NMDA-рецепторів викликають дозозалежну деескалацію маркерів нейродеструкції (рівнів NSE та білка S100 в сироватці крові), амортизують апоптичні, нейрогліопроліферативні, мікроциркуляторні розлади за

ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору. При цьому найбільшу ефективність щодо корекції вказаних процесів в сітківці ока виявляє інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат у дозі 5 мг/кг в/в, а у дозі 2,5 мг/кг в/в цей засіб зіставлявся з інгібітором фенциклідинового сайту мемантином у дозі 20 мг/кг в/шл, відповідно.

*Дослідження впливу модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора.* Результати наших досліджень засвідчили, що через 24 години після ІР в сітківці ока щурів виявлялись ознаки енергодефіциту, оксидативного та нітрозативного стресу, зниження активності антиоксидантної системи на фоні підвищення рівня глутамату. Так, у щурів групи 2 (контрольна патологія) в сітківці рівень АТФ був нижчим в 2,42 рази, рівень МДА та КГП - вищим в 2,57 та 2,52 рази, активність глутатіонпероксидази (ГПО) - нижчою в 2,34 рази, вміст метаболітів NO (нітратів та нітритів) - вищим в 3,37 рази, а рівень глутамату - вищим в 2,03 рази, ніж у псевдооперованих щурів групи 1 ( $p < 0,01$ ).

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

Травматичне ушкодження зорового аналізатора у кролів також супроводжувалось виразними метаболічними розладами в посттравматичному періоді (табл. 4). Через 24 години після контузії ока в сітківці кролів рівень АТФ був нижчим в 2,1 рази, рівні МДА, КГП, нітритів та нітратів, глутамату – вищими в 2,32; 3,56; 3,23 та 2,02 рази, активність ГПО – нижчою в 1,88 рази, ніж у інтактних тварин. Застосування амантадину та мемантину забезпечувало деескалацію біохімічних змін в сітківці кролів з травматичним ушкодженням зорового аналізатора. При цьому амантадин більш ефективно стримував розвиток енергодефіциту та оксидативного стресу, ніж мемантин, і зіставлявся з ним за здатністю коригувати рівень метаболітів NO та глутамату.

Аналіз кореляційних зв'язків між сироватковими маркерами нейроретинодеструкції та біохімічними показниками сітківки за ішемічного та постконтузійного ушкодження ока виявив статистично значущі закономірності. Виявилось, що за умов ішемічного ушкодження зорового аналізатору між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці виявляється найбільш

сильний прямий кореляційний зв'язок ( $r=0,72$ ). Цей факт є свідченням тригерної ролі глутаматної ексайтотоксичності в пошкодженні нейронів сітківки за умов ішемії/реперфузії. В той же час, білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ( $r=0,65; 0,64, p<0,05$ ). За умов травматичного ушкодження зорового аналізатору найбільш сильний прямий зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та маркерами оксидативного та нітрозативного стресу в сітківці ( $r=0,66-0,78, p<0,05$ ). Виявлені асоціації є свідченням тригерної ролі чинників первинної альтерації нейронів сітківки за умов контузійної травми ока. Натомість, білок S100 найбільш сильно прямо корелював з рівнем глутамату та КГП ( $r=0,68; 0,66$ ).

Таблиця 4 - Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні показники сітківки кролів з травматичним ураженням зорового аналізатора ( $M\pm m, n=6$ )

Показники	Групи тварин			
	Інтактні	Контузія ока + 0,9% NaCl	Контузія ока + амантадин	Контузія ока + мемантин
	1	2	3	4
АТФ, нмоль/мг протеїну	53,4±1,94	25,5±1,87**	40,2±1,56*#	34,4±1,16*#^
МДА, нмоль/мг протеїну	3,62±0,22	8,40±0,16**	4,59±0,26*#	5,85±0,20*#^
КГП, нмоль/мг протеїну	1,11±0,08	3,96±0,08**	1,34±0,17*#	2,01±0,07*#^
ГПО, мкмоль/хв на 1 мг протеїну	6,23±0,28	3,31±0,27**	4,91±0,14*#	4,03±0,14*#^
Нітрити + нітрати, нмоль/мг протеїну	5,85±0,28	18,9±0,82**	10,4±0,20*#	11,3±0,63*#
Глутамат, нмоль/мг протеїну	8,18±0,36	16,5±0,89**	9,89±0,55*#	10,8±0,29*#

Примітки:

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

При застосуванні модуляторів NMDA-рецепторів (амантадину та мемантину) кореляційні зв'язки між рівнем глутамату, маркерами оксидативного та нітрозативного стресу, маркерами енергодефіциту втрачали вірогідність і зменшувались за силою як за ішемічного, так і за травматичного ушкодження зорового аналізатора. Таким чином, модулятори поліамінового та фенціклідинового сайтів NMDA-рецепторів виявляли нейроретинопротекторний ефект і за рахунок метаботропного ефекту, що реалізувався як за ішемічного, так і за травматичного ушкодження зорового аналізатора у тварин. Інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат (5 мг/кг в/в) можна розглядати як препарат-лідер щодо корекції метаботропної складової нейроретинопротекції.

На основі результатів власних досліджень створена схема механізмів нейроретинодеструкції за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору та точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів (рис. 2).



Рисунок 2 - Схема біохімічних механізмів нейроретинодеструкції за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору та точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів.

Примітки: пунктирні стрілки показують взаємозв'язок між глутаматною ексайтотоксичністю та іншими механізмами нейроретинодеструкції; кружечки по ходу стрілок вказують на точки прикладання дії модуляторів NMDA-рецепторів.

## ВИСНОВКИ

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

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

2. Ішемічне та травматичну ураження зорового аналізатору у тварин асоціюється з підвищенням цитометричних маркерів апоптозу (клітин у фазі SUB-G0G1 - в 20,2 та 14,6 рази,  $p < 0,001$ ), та нейрогліопрولیферативної активності (клітин у фазі S в 7,1 та 4,41 рази,  $p < 0,001$ ). За цих умов введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало зниження часток клітин у фазі SUB-G0G1 (в 1,6-2,6 рази) та фазі S (в 1,5-3,0 рази,  $p < 0,05$ ) із максимальним ефектом у амантадину сульфату.

3. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшують (в 1,5-2,5 рази,  $p < 0,05$ ) мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді. За здатністю амортизувати судинні розлади інгібітор поліамінового сайту амантадин сульфат перевершував інші модулятори NMDA-рецепторів.

4. Ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатора у тварин характеризується зниженням рівня АТФ (в 2,1-2,5 рази,  $p < 0,001$ ), підвищенням (в 2,0-3,2 рази,  $p < 0,001$ ) рівнів МДА, карбонільних груп протеїнів, нітратів та нітритів, глутамату, зниженням (в 1,7-2,4 рази,  $p < 0,001$ ) активності глутатіонпероксидази в сітківці ока. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів зменшує метаболічні зміни в сітківці, при цьому амантадину сульфату перевершує мемантин в 1,2-1,5 рази ( $p < 0,05$ ) за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати процеси ліпопероксидації та окисної модифікації білків, відновлювати активність глутатіонпероксидази, й зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівні глутамату та метаболітів NO в сітківці за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора у тварин.

5. За ішемічного ураження зорового аналізатора найбільш сильний зв'язок виявлявся між сироватковим рівнем NSE та рівнем глутамату в сітківці ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,05$ ), зв'язок з іншими метаболічними маркерами був середньої сили ( $r = |0,45-0,62|$ ,  $p < 0,05$ ). За травматичного ураження зорового аналізатору найбільш сильний зв'язок виявлявся між рівнем NSE та вмістом АТФ ( $r = -0,70$ ), маркерами оксидативного та нітрозативного стресу ( $r = 0,66-0,78$ ), зв'язок з рівнем глутамату був середньої сили ( $r = 0,56$ ). Рівень білка S100 в крові корелює в сітківці з рівнем глутамату, карбонільних груп, активністю глутатіонпероксидази ( $r = |0,56-0,68|$ ,  $p < 0,05$ ) за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору. За дії модуляторів NMDA-рецепторів асоціації між маркерами нейродеструкції та метаболічними змінами в сітківці ока зменшуються за силою та втрачають значущість ( $r < |0,3|$ ). Для нейроретинопротекції більш перспективним засобом слід вважати інгібітор поліамінового сайту амантадину сульфат.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Комнацька К. М., Черешнюк І. Л., Повх В. Л., Ходаківський О. А. Комплексний підхід до доклінічної оцінки безпечності нейроретинопротекторів при різних шляхах введення // Вісник морфології. 2015. 21(2). С. 379-385. (Особистий внесок - визначення фонових рівнів нейромаркерів в сироватці крові методом ІФА, участь у дослідженні показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, участь в обробці та аналізі результатів щодо груп інтактних та псевдооперованих тварин, участь у формулюванні висновків та підготовці



статті до друку).

2. **Повх В. Л.** Нейроретинопротекторні властивості модуляторів активності NMDA-рецепторів при ішемічному ураженні ока (експериментальне дослідження) // Вісник морфології. 2016. 22(1). С. 53-57.
3. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Загорій Г. В., Ходаківський О. А. Використання нейромаркерів (білок S 100) та методу протокової цитометрії для порівняльної оцінки впливу блокаторів NMDA-рецепторів на нейропроліферативні процеси в сітківці та зоровому нерві в умовах модельної ішемії-реперфузії ока // Світ медицини та біології. 2016. 2(56). С. 159-164. (Особистий внесок – участь в моделюванні ішемії/реперфузії ока у щурів, дослідження впливу блокаторів NMDA-рецепторів на рівень білка S100 в сироватці крові методом ІФА, дослідження цитометричних маркерів в сітківці ока щурів, статистична обробка матеріалу, оформлення статті).
4. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Загорій Г. В., Ходаковський А. А. Цереброваскулярные эффекты блокаторов NMDA-рецепторов и мексидола на фоне аллоксанового сахарного диабета, а также их влияние на течение метаболических процессов в сетчатке монгольских песчанок в острый постперфузионный период // Врач-аспирант. 2016. 74(1.2). С. 295-303. (Особистий внесок – проведення частини досліджень щодо показників метаболічного стану сітківки ока тварин, статистична обробка отриманих результатів та написання частини статті).
5. **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А., Ходаківський М. А. Порівняльна оцінка величини антиапоптотичного ефекту серед модуляторів активності NMDA-рецепторів в умовах модельної перехідної ішемії реперфузії ока за даними протоково-цитометричного аналізу // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2016. 4. С. 84-87. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, підготовка та моделювання ішемії /реперфузії ока у тварин, проведення цитометричних досліджень в суспензії клітин сітківки, аналіз та статистичній обробка отриманих даних, участь в обговоренні результатів та формулюванні висновків, оформлення статті).
6. **Повх В. Л.**, Фоміна Л. В., Ходаківський М. А., Ходаківський О. А. Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату на мікроциркуляцію в судинах заднього полюса ока після контузії або в гострий постреперфузійний період на тлі реканалізації а. ophthalmica // Буковинський медичний вісник. 2017. 1(81). С. 106-111. (Особистий внесок - відтворення модельної патології, доплерографічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка та переклад резюме, оформлення і подача до друку статті).
7. **Повх В. Л.** Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на біохімічні зміни в сітківці при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(1). С. 136-141.
8. **Povh V. L.**, Zaichko N. V., Melnyk A.V., Khodakivskiy O. A. Association of neuroretina destruction markers with retinal level of hydrogen sulfide in traumatic injury of the visual analyzer // Медична та клінічна хімія. 2018. 20(2). С. 5-11 (Особистий внесок - визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові

спектрофотометричним методом, участь у дослідженні показників клітинного циклу методом протокової цитометрії, рівня глутамату в сітківці ока хроматографічним методом, обробка та аналіз результатів щодо груп інтактних тварин та кролів з контузійною травмою ока).

9. Черешнюк І. Л., Комнацька К. М., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109789 Україна МПК А61F 9/00 Спосіб моделювання контузії ока для скринінгової оцінки нейроретинопротективної активності лікарських засобів та біологічно активних речовин. № u 201601524; заявл. 19.02.16; опубл. 12.09.16, Бюл. № 17, 2016 р. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, участь у розробці та відтворенні модельної патології, участь у проведенні скринінгових досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка і оформлення патенту).
10. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Комнацька К. М., Ходаківський О. А. Пат. на корисну модель № 109424 Україна МПК А61К 31/00 А61Р 27/02 Застосування цитопротекторів, вибраних з ряду цитиколіну, мелатоніну, мексидолу, корвітину, тіотриазоліну та розчину сульфату магнію, як нейроретинопротекторів. № u 201601703 ; заявл. 23.02.16; опубл. 25.08.16, Бюл. № 16, 2016 р. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, проведення досліджень у серії визначення нейроретинопротекторної активності магнію сульфату: моделювання патології, проведення лікування, забір матеріалу, виконання біохімічних досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування висновку).
11. Черешнюк І. Л., **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А., Загорій Г. В. Оцінка ефективності експериментальної терапії контузії зорового аналізатора промисловим зразком ампульного розчину 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол гідрохлориду („Адемол”) або амантадином сульфатом („ПК-МЕРЦ”) за маркером нейропроліферативних процесів – рівнем білка S-100 // VIII Нац. з’їзд фармацевтів України : тези доп., м. Харків, 13–16 верес. 2016 р. X., 2016. С. 125–126. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, формування загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез).
12. **Повх В. Л.** Морфо-функціональна оцінка офтальмопротекторних ефектів мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при експериментальній перехідній ішемії ока // V Міжнар. науково-практична конференція молодих вчених : тези доп., м. Вінниця, 15–16 трав. 2014 р. В., 2014. С. 142-145.
13. **Повх В. Л.**, Ходаківський О. А. Порівняльна оцінка нейроретинопротекторної дії мемантину та розчинів амантадину і магнію сульфату при контузійній травмі ока у кролів за активністю нейрон-специфічної енолази // Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, пам’яті професора В. В. Дунаєва : матеріали конф., м. Запоріжжя, 24-25 листоп. 2016 р. З., 2016. – С. 63-64. (Особистий внесок дисертанта: пошук та аналіз літературних джерел, відтворення модельної патології, виконання запланованих досліджень, статистична обробка отриманих даних, формування

загального висновку, підготовка, оформлення та подача тез до друку).

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

## АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктор філософії) за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія. – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2018.

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

Встановлено, що ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатору асоціюється з підвищенням маркерів нейродеструкції в сироватці крові (NSE та білка S100), посиленням апоптозу клітин сітківки та нейрогліопрولیферативної

активності, зменшенням мікроциркуляції в сітківці ока. Поряд з цим відмічається ряд метаболічних розладів - енергодефіцит, оксидативний та нітрозативний стрес, зменшення активності ферментної антиоксидантної системи, підвищення рівня глутамату в сітківці ока.

Терапевтичне застосування інгібіторів NMDA-рецепторів на тлі ішемії / реперфузії та контузії ока супроводжувалось дозозалежним зниженням рівнів NSE та білка S100, виявляло антиапоптотичний та антипроліферативний ефекти, зменшувало мікроциркуляторні порушення та коригувало метаболічні розлади в сітківці ока. Серед досліджуваних інгібіторів найбільш потужний нейроретинопротективний та метаботропний ефекти відмічались у амантадину сульфат, а найменш виразні - у мемантину.

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

### АННОТАЦИЯ

**Повх В.Л. Роль модуляторов NMDA-рецепторов в механизмах нейроретинопротекции при ишемическом и травматическом повреждении зрительного анализатора (экспериментальное исследование).** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (доктор философии) по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. – Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2018.

Диссертация посвящена установлению роли модуляторов NMDA-рецепторов в механизмах нейроретинопротекции при ишемическом и травматическом поражении глаза и экспериментальному обоснованию новых подходов к коррекции патологии зрительного анализатора.

Установлено, что ишемическое и травматическое поражение зрительного анализатора ассоциируется с повышением маркеров нейродеструкции в сыворотке крови (NSE и белка S100), усилением апоптоза клеток сетчатки и нейроглиопролиферативной активности, уменьшением микроциркуляции в сетчатке глаза. Наряду с этим отмечается ряд метаболических расстройств - энергодефицит, оксидативный и нитрозативный стресс, уменьшение активности ферментной антиоксидантной системы, повышение уровня глутамата в сетчатке глаза.

Терапевтическое применение ингибиторов NMDA-рецепторов на фоне ишемии / реперфузии и контузии глаза сопровождалось дозозависимым снижением уровней NSE и белка S100, проявляло антиапоптотический и антипролиферативный эффекты, уменьшало микроциркуляторные нарушения и корректировало метаболические расстройства в сетчатке глаза. Среди исследуемых ингибиторов наиболее мощный нейроретинопротективний и метаботропний ефекты отмечались у амантадина сульфат, а наименее выразительные - у мемантина.

**Ключевые слова:** ишемия глаза, контузия зрительного анализатора,

нейроретинопротекция, NMDA-рецепторы, амантадина сульфат, мемантин, магния сульфат.

### ANNOTATION

**Povkh V.L. The role of NMDA-receptor modulators in the mechanisms of neuroretinoprotection in ischemic and traumatic injuries of a visual analyzer (experimental research).** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The dissertation for scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 14.01.32 – Medical biochemistry. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2018.

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

It was established that the experimental ischemic lesions of the visual analyzer in rats were associated with increased markers of the degeneration of neurons in ganglionic layers of retina (neuronecrosis) in the blood serum - NSE (on 1 and 7 in 11.0 and 4.3 times,  $p < 0.001$ ) and S100 protein (on the 1st and the 7th day - in 8.4 and 14.7 times,  $p < 0.001$ ). Traumatic injury to the visual analyzer in rabbits is characterized by the more significant increase of NSE levels in the blood serum at the indicated time (43.4 and 42.3 times,  $p < 0.001$ ) and S100 protein (20.5 and 38.8 times,  $p < 0.001$ ) relative to the intact animals. For ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, the injection of NMDA-receptor modulators caused a dose-dependent decrease in NSE levels (2-6 times,  $p < 0.05$ ) and S100 protein (2-3 times,  $p < 0.05$ ) with a maximal effect in amantadine sulfate in a dose of 5 mg/kg i/v, memantine in a dose of 20 mg/kg i/ventricular, magnesium sulfate in a dose of 250 mg/kg i/v.

The ischemic affection of the visual analyzer is associated with an increase in the level of cytometric markers of apoptosis (cells in the SUB-G0G1 phase) and neuroglyoproliferative activity (cells in phase S) at 20.2 and 7.1 times ( $p < 0.001$ ) for the 1st day, at 14, 8 and 6.0 times ( $p < 0.001$ ) on the 7th day, respectively. In the traumatic affection of the visual analyzer in the rabbits, the percentage of retinal cells in the SUB-G0G1 phase and in the S-phase was higher at 14.6 and 4.41 times at the 1st day; in 10.0 and 7.70 times - on the 7th day ( $p < 0.001$ ). For the ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, the injection of NMDA-receptor modulators caused a decrease in cellular particles in the SUB-G0G1 phase (1.6-2.6 times) and phase S (1.5-3.0 times,  $p < 0.05$ ) with a maximum effect on amantadine sulfate (5 mg/kg i/v).

Inhibitors of NMDA receptors significantly reduce (in 1.5-2.5 times,  $p < 0.05$ ) microcirculatory disturbances of an ischemic and a traumatic damage to the visual analyzer with a maximum effect on amantadine sulfate (5 mg/kg i/v). By the ability to amortize vascular disorders, NMDA-receptor modulators could be placed as follows - amantadine sulfate > memantine > magnesium sulfate.

Ischemic defeat of the visual analyzer in rats on the 7th day after restoration of blood circulation is characterized by a decrease in the level of ATP (2.6 times,  $p < 0.001$ ), increased levels of MDA, carbonyl groups of proteins, nitrates and nitrites, glutamate (2.4-2.7 times,  $p < 0.001$ ), a decrease in the activity of glutathione peroxidase (2.4 times,  $p$

<0.001) at the 1st day with a reliable, but a weak deescalation of these changes (1.2-1.3 times,  $p < 0.05$ ). The injury of the visual analyzer of traumatic genesis characterized by an energy deficit, signs of oxidative and nitrosativative stress, an increase in glutamate levels in the retina at the 1st day with a worsening / deepening (in 1,3-1,5 times,  $p < 0,05$ ) of all detected violations by the 7th day. The use of NMDA-receptor modulators reduces metabolic disturbances in the retina of the eye through ischemic and traumatic lesions of the visual analyzer, with amantadine sulfate (5 mg/kg i/v) exceeding memantine (20 mg/kg i/v) in 1.2-1.5 times ( $p < 0.05$ ) by the ability to correct energy deficit, suppress the activity of lipoperoxidation processes and oxidative modification of proteins, to restore antioxidant activity of glutathione peroxidase. Amantadine sulfate is compared with memantine due to the ability to adjust the level of NO metabolites and reduce glutamate levels in the retina of the eye for ischemic and traumatic damage to the visual analyzer in animals.

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

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	- аденозинтрифосфорна кислота
в/в	- внутрішньовенно
в/шл	- внутрішньошлунково
ВНМУ	- Вінницький національний медичний університет
ГПО	- глутатіонпероксидаза
ДНК	- дезоксирибонуклеїнова кислота
ІР	- ішемія / реперфузія
КГП	- карбонільні групи протеїнів
МДА	- малоновий діальдегід
МОЗ	- Міністерство охорони здоров'я
NMDA	- N-метил D-аспартат
NO	- нітроген монооксид (оксид азоту)
NSE	- нейронспецифічна енолаза
S100	- білок S100

---

Підписано до друку 27.11.2018 р. Замовл. № 692.  
Формат 60x90 1/16 ум. друк. арк. 1,2 друк офсетний.  
Наклад 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

