



УДК 617.735-002-615.099.092:612.085.1

Т. Ю. Іванічук, О. П. Сотнікова

## ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАХИСНОЇ ДІЇ МАРЕПОЛІМІЄЛУ, ЦИСТЕЇНУ Й АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ ПРИ МОДЕЛЬОВАНОМУ ДИСТРОФІЧНОМУ УРАЖЕННІ СІТКІВКИ ТА ЗОРОВОЇ КОРИ

Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України, Одеса

За останні десятиліття екологічні зрушення, пов'язані з науково-технічним прогресом, призвели до збільшення факторів, що спричинюють зростання кількості захворювань зорового аналізатора. Основне місце серед них займають токсичні речовини, професійні шкідливості, інфекції, географічний фактор [4; 5].

Отже, однією з провідних проблем лікувально-профілактичної медицини є керування механізмами фізіологічної регенерації.

Дія несприятливих факторів навколишнього середовища на організм людини призводить до порушення діяльності головних регуляторних систем організму людини: центральної та вегетативної нервових систем, ендокринної, імунної та інших систем, що містять як тканинні, так і гуморальні компоненти.

В основі дистрофічних уражень органів лежать порушення механізму нервової трофіки, які визначаються сукупністю складних перебудов у нервово-гуморальних системах, що здійснюють контроль за структурою, організацією й біохімічними процесами в клітинах [12].

Порушення зорових функцій вимагає пошуку ефективних фармакологічних засобів, що гальмують або ослаблюють розвиток уражень зорового ана-

лізатора після інтоксикації [2; 3; 7; 9]. Особлива увага у зв'язку з цим приділяється метаболічним засобам, які активно впливають на процеси обміну в організмі.

**Мета** дослідження — порівняльне вивчення фармакобіологічної дії відомих метаболічних засобів — аскорбінової кислоти, цистеїну та нового полімікроелементного препарату мареполімієлу — на рівень тіолів при порушенні метаболізму сітківки та зорової кори. Усі досліджувані нами біологічно активні речовини тою чи іншою мірою характеризуються антиоксидантною дією [11; 14]. Вони є біологічними регуляторами і можуть виявляти захисну дію при регенеративно-пластичному дефіциті, що відбувається при впливі екологічно несприятливих факторів і токсичних речовин на організм.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконано на 159 щурах обох статей лінії Вістар (140 піддослідних і 19 інтактних) масою 150–250 г. Проведено чотири серії експериментів. При моделюванні метаболічних ушкоджень сітківки (I група) тваринам одноразово у хвостову вену вводили інгібітор гліколізу монобромацетат двома дозами: 1,0–1,5 мг/кг

(1-ша доза) і 5,0–6,0 мг/кг (2-га доза). Максимальна його концентрація була в 4–6 разів менша за ту, що звичайно застосовується для моделювання дистрофічного ураження сітківки. У досліджуваних групах вивчалася профілактична захисна дія метаболічних засобів, які вводилися курсом попередньо до токсичного ушкодження сітківки та зорової кори монобромацетатом: II група — на фоні введення мареполімієлу дозою 1 мл/кг підшкірно (21 доба); III група — на фоні введення цистеїну («Здоров'я», Україна) дозою 100 мг/кг підшкірно (10 діб); IV група — на фоні введення аскорбінової кислоти («Дарниця», Україна) дозою 15 мг/кг внутрішньом'язово (10 діб). Контролем у всіх дослідних групах були інтактні щури. Спостереження проводилися в динаміці розвитку дистрофічного процесу.

Взяття матеріалу проводилося через 0,5; 2; 6; 12; 24; 48; 72 год у всіх групах.

Евтаназія тварин, що утримувалися в стандартних умовах віварію з вільним доступом до їжі і води, відбувалася шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися рекомендацій Європейської комісії щодо проведення медико-біологічних дослі-



дженів із використанням тварин [1], методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України [8] та вимог комісії з біоетики Інституту очних хвороб і тканинної терапії (протокол № 8 від 7.11.2006 р.).

Тіолові сполуки визначалися за загальноприйнятою гістохімічною методикою (R. Barrnett, A. Zeligman, 1954) [10; 13]. За допомогою цього методу виявляли сірковмісні білки, які містять у своєму складі амінокислоти: цистеїн і цистин.

Кількісні зміни даних цитохімічних показників досліджувалися у цитоплазмі гангліозних клітин сітківки і нейронів зорової кори та ядрах фоторецепторів сітківки і глії.

Кількісна оцінка гістохімічних реакцій проводилася на цитофотометрії MPI-5 (Польща). Оглядове забарвлення здійснювалося за методом Ніссля [4]. Результати всіх експериментів оброблені за допомогою комп'ютерного пакета програм "Excel" та "Statistica 6.0" із використанням критерію Стьюдента при ймовірності помилки  $P < 0,05$  [6].

### Результати дослідження та їх обговорення

У I дослідній групі виявлено, що при використанні мінімальної дози монобромцетової кислоти (1,0–1,5 мг/кг, 1-ша доза) у сітківці відбувалося вірогідне зниження рівня сульфгідрильних груп у період 0,5–2 год на 38–47 % у гангліозних клітинах і на 42–38 % ( $P < 0,05$ ) — у фоторецепторах. Дисульфідні при цьому виявляли схожий за амплітудою підйом. Через 6 год наставало помітне регулювання рівня тіолів, що закінчувалося повним відновленням їх у фоторецепторах до 2 діб (рис. 1, а).

У цитоплазмі нейронів зорової кори спостерігався короточасний (до 2 год) і досить невиразний підйом оптичної густини SH-груп — 20 % ( $P < 0,05$ ). У глії суттєвих змін оптичної густини тіолів не реєструвалося ( $P > 0,05$ ).

При збільшенні дози інгібітора досить демонстративними виявилися зміни тіолових сполук (рис. 1, б). Так, вірогідне зниження рівня сульфгідрильних груп у гангліозних клітинах

сітківки відмічалось з 0,5 год до 2 діб у середньому на 46 % ( $P < 0,05$ ). У подальшому спостерігалась їхня нормалізація. У фоторецепторах цей процес починався з 24 год, а до цього терміну оптична густина SH-груп була також вірогідно зниженою на 40 % ( $P < 0,05$ ).

Рівень дисульфідів у гангліозних клітинах і фоторецепторах був значно зниженим у перші два терміни на 53 і 51 % ( $P < 0,05$ ) відповідно (див. рис. 1,

б). З 6 год у всіх мікроструктурах сітківки відмічалось підвищення рівня оптичної густини SS-груп: до 48 год у гангліозних клітинах він був вищим за контрольні значення в середньому на 40 %, а у фоторецепторах — у середньому на 24 % ( $P < 0,05$ ) до 24 год.

Згідно з отриманими даними, через 0,5 год після ін'єкції інгібітора концентрація сульфгідрильних і дисульфідних груп у цитоплазмі нейронів зорової



- ▨ SH-групи у цитоплазмі гангліозних клітин (I група)
- SH-групи у ядрах фоторецепторів (I група)
- SS-групи у цитоплазмі гангліозних клітин (I група)
- △ SS-групи у ядрах фоторецепторів (I група)
- ▨ SH-групи у цитоплазмі гангліозних клітин (II група)
- ▨ SH-групи у ядрах фоторецепторів (II група)
- SS-групи у цитоплазмі гангліозних клітин (II група)
- SS-групи у ядрах фоторецепторів (II група)

Рис. 1. Вплив профілактичного курсового введення мареполімієлу на викликані монобромцетатом порушення оптичної густини тіолів сітківки: а — доза 1-ша (1,0–1,5 мг/кг); б — доза 2-га (5,0–6,0 мг/кг). На рис. 1–3: \* — вірогідність різниці щодо контролю ( $P < 0,05$ )



кори збільшувалася відповідно на 24 і 21 % ( $P < 0,05$ ), зберігаючись у цих межах до 12 год. Глія характеризувалася рівнозначним зниженням показників (див. рис. 1, б).

На фоні попереднього введення мареполімієлу при використанні малих доз монобромацетату концентрація сульфгідрильних груп у гангліозних клітинах була вірогідно знижена протягом 0,5–2 год на 15 % ( $P < 0,05$ ) (див. рис. 1, а). Через 12–24 год після введення інгібітора реєструвався максимум підвищення оптичної густини SH-груп 24 % ( $P < 0,05$ ). У фоторецепторах зміни за спрямованістю збігалися з гангліозними клітинами, але були менш виражені — у середньому 14 % ( $P < 0,05$ ).

Через 2 доби в обох клітинних структурах відзначалася стабілізація концентрації SH-груп (див. рис. 1, а).

У зоровій корі різниця між контрольним і дослідним рівнем тіолів була незначною. Як і в сітківці, оптична густина SH-груп у нейронах зорової кори була підвищена аж до 12 год після попереднього введення мареполімієлу на 18 % ( $P < 0,05$ ). У наступні терміни істотних змін оптичної густини сульфгідрильних груп не відзначалося. Через 72 год вона була нижча за контрольні значення на 12 % ( $P < 0,05$ ). У період 0,5–6 год глія характеризувалася зниженням рівня SH-груп на 17 % ( $P < 0,05$ ). Надалі наставала стабілізація.

Концентрація дисульфідів не характеризувалася помітними змінами у глії. У нейронах вона була незначною мірою підвищена: через 0,5 год — 11 % і в період з 6 до 12 год — 13 % ( $P < 0,05$ ). В інші терміни рівень SS-груп залишався практично без змін.

Підвищення концентрації монобромацетату до 5,0–6,0 мг/кг (2-га доза) на фоні попереднього введення мареполімієлу призводило до збільшення концентрації сульфгідрильних груп у всіх вивчених клітинних структурах сітківки в перші 3–4 терміни (у гангліозних клітинах — 20 %, у фоторецепторах — 15 % ( $P < 0,05$ )) (див. рис. 1, б).

Час повної нормалізації змін SH-груп у фоторецепторах припадав на 12 год, тоді як у гангліозних клітинах вона наставала через 2 доби, після незначного зниження показників у середньому на 12 % ( $P < 0,05$ ).

Оптична густина дисульфідів лише в перші два терміни була незначною мірою підвищена. Через 6 год ці зміни не реєструвалися ні в гангліозних клітинах, ні в фоторецепторах.

Після попереднього введення мареполімієлу рівень SH-груп у перші три терміни характеризувався зниженням на 20 % ( $P < 0,05$ ) у нейронах зорової кори (таблиця).

У глії порівняно з нейронами спрямованість процесів була протилежною. Підвищення концентрації сульфгідрильних груп при введенні мареполімієлу становило в середньому 14 % ( $P < 0,02–0,001$ ). Через 12 год відзначалася стабілізація показників.

Оптична густина дисульфідів в обох клітинних структурах лише в перші 2 терміни була дещо підвищеною (гангліозні клітини — 15 %, фоторецептори — 10 % ( $P < 0,05$ )). Через 6 год її зміни в сітківці не реєструвалися.

У зоровій корі дисульфідів в більш пізні терміни (починаючи з 1-ї доби) не зазнавали значних змін й істотно не відрізнялися від контролю ( $P > 0,05$ ).

При введенні 1-ї дози монобромацетату після курсового впливу цистеїну аж до 1-ї доби в сітківці щурів реєструвалося зниження оптичної густини сульфгідрильних груп (гангліозні клітини — 22 %, фоторецептори — 14 % ( $P < 0,05$ )). Наступні два терміни характеризувалися незначним підвищенням рівня, після чого відзначалася його стабілізація (3 доби) як у гангліозних клітинах, так і у фоторецепторах.

Таблиця  
Вплив попереднього курсового введення мареполімієлу на викликані монобромацетатом (2-га доза — 5,0–6,0 мг/кг) порушення оптичної густини тіолів зорової кори

Група тварин	Вид клітин	Оптична густина тіолів, ум. од., $M \pm m$ , $n=100^*$		% до контролю	
		SH-групи	SS-групи	SH-групи	SS-групи
Інтактна	Нейрони	31,80±0,64	17,40±0,36	100	100
	Глія	6,60±0,12	3,40±0,06	100	100
Через 0,5 год після введення інгібітора	Нейрони	26,10±0,51*	17,20±0,33	82	98,9
	Глія	7,40±0,15*	4,10±0,07*	112,1	120,6
Через 2 год після введення інгібітора	Нейрони	24,50±0,49*	14,80±0,31*	77	85,1
	Глія	7,70±0,15*	3,70±0,08*	116,7	108,8
Через 6 год після введення інгібітора	Нейрони	25,50±0,55*	16,20±0,34*	80,2	93,1
	Глія	7,40±0,16*	3,60±0,07	112,1	105,9
Через 12 год після введення інгібітора	Нейрони	31,00±0,62	16,80±0,33	97,5	96,6
	Глія	7,10±0,14*	3,60±0,07	107,6	105,9
Через 24 год після введення інгібітора	Нейрони	29,40±0,62*	16,30±0,40*	92,5	93,7
	Глія	6,40±0,11	3,50±0,06	97	102,9
Через 48 год після введення інгібітора	Нейрони	30,10±0,65	16,60±0,35	94,7	95,4
	Глія	6,10±0,15*	3,60±0,07	92,4	105,9
Через 72 год після введення інгібітора	Нейрони	32,50±0,66	16,50±0,37	102,2	94,8
	Глія	7,00±0,15	3,50±0,06	106	102,9

Примітка. \* — вірогідність різниці щодо контролю ( $P < 0,05$ ).



Після деякого підвищення оптичної густини SS-груп у гангліозних клітинах сітківки через 0,5 год на 10 % ( $P < 0,05$ ) у період 6–12 год відзначалося її вірогідне зниження в середньому на 14 % ( $P < 0,05$ ). Через 1 добу рівень сульфгідрильних груп стабілізувався. Кількісних змін дисульфідів у фоторецепторах не реєструвалося ( $P > 0,5$ ).

У нейронах зорової кори оптична густина сульфгідрильних груп була знижена у період 0,5–12 год у середньому на 20 % ( $P < 0,05$ ) (рис. 2).

У зоровій корі рівень дисульфідів був практично інтактним у всі охоплені спостереженнями терміни. Лише через 0,5 год він знижувався в нейронах у середньому на 19 % ( $P < 0,05$ ) (див. рис. 2).

При збільшенні концентрації монобромцетату максимальне підвищення тіолів у сітківці припадало на період з 0,5 до 2 год (SH-групи — 27 %, SS-групи — 18 % ( $P < 0,05$ )).

У зоровій корі з 0,5 до 6 год на фоні значного зниження рівня сульфгідрильних груп у нейронах (у середньому на 23 %) відзначалося його збільшення в глії (у середньому на 28 % ( $P < 0,05$ )). Дисульфідів при цьому істотно не змінювалися.

При мінімальній дозі монобромцетату оптична густина SH-груп в умовах попереднього курсового застосування аскорбінової кислоти була значно підвищена в період 0,5–2 год в обох клітинних структурах сітківки ( $P < 0,05$ ). Незначне зниження її через 6 год змінювалося відновленням рівня сульфгідрильних груп.

Оптична густина SS-груп у гангліозних клітинах сітківки у перші два терміни була підвищена у середньому на 18 % ( $P < 0,05$ ), після чого реєструвалась її стабілізація. Зміни в фоторецепторах були практично відсутні ( $P > 0,5$ ).

Починаючи з 6 год для дисульфідів і з 12 год — для сульфгідрильних груп не реєструвалося відмінностей від їх вихідного рівня.

Рівень SH-груп у нейронах зорової кори збільшувався в

% відносно інтактних показників, тіоли

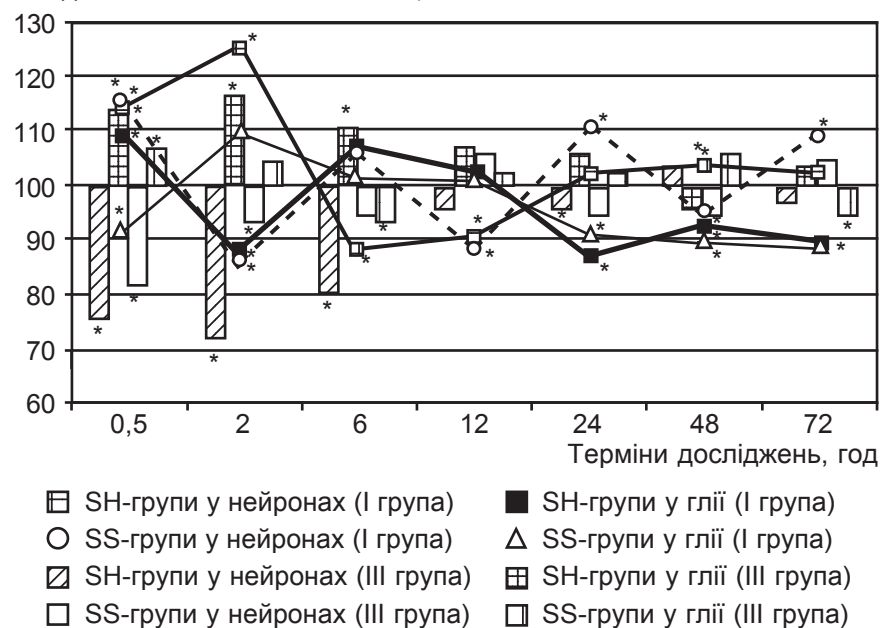


Рис. 2. Вплив профілактичного курсового введення цистеїну на викликані монобромцетатом (доза I — 1,0–1,5 мг/кг) порушення оптичної густини тіолів зорової кори

% відносно інтактних показників, тіоли

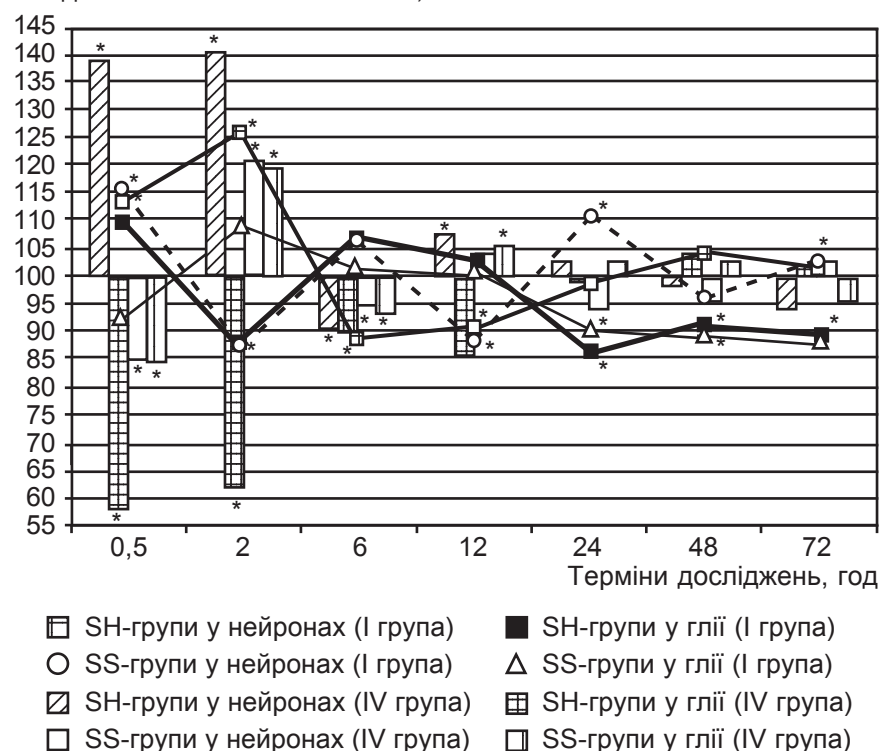


Рис. 3. Вплив профілактичного курсового введення цистеїну на викликані монобромцетатом (доза I — 1,0–1,5 мг/кг) порушення оптичної густини тіолів зорової кори

перші два терміни в середньому на 40 % (рис. 3). У подальші терміни він стабілізувався і не відрізнявся від початкового. У глії оптична густина сульфгідрильних груп була знижена з

0,5 до 2 год у середньому на 39 % ( $P < 0,05$ ).

У нейронах зорової кори через 0,5 год після впливу монобромцетату рівень дисульфідів знижувався в середньому



на 15 % ( $P < 0,05$ ) (див. рис. 3). Через 2 год він уже був підвищеним відповідно на 20 % ( $P < 0,05$ ). Інші терміни не характеризувалися змінами рівня SS-груп. Зміни в глії за спрямованістю і в кількісному відношенні в пізніші терміни співпадали з нейронами.

При збільшенні дози монобромацетату до 5,0–6,0 мг/кг на фоні попереднього введення аскорбінової кислоти на 12 год раніше, ніж для цистеїну, відзначалися контрольні значення SH-груп у фоторецепторах. У гангліозних клітинах повернення до контрольних значень визначалося через 2 доби, після незначного їх зниження на 12 % ( $P < 0,05$ ).

Рівень SS-груп при застосуванні аскорбінової кислоти протягом 6 год був значно підвищеним — у гангліозних клітинах на 26 %, а у фоторецепторах — на 27 % ( $P < 0,05$ ).

У нейронах зорової кори оптична густина сульфгідрильних груп аж до 12 год була суттєво нижчою за контрольні значення. Зниження її становило в середньому 26 % ( $P < 0,05$ ).

У глії через 0,5–2 год реєструвалося підвищення рівня SH-груп на 35 % ( $P < 0,05$ ). Через 12 год відзначалася стабілізація показників.

Рівень дисульфідів у сітківці порівняно з контролем у всіх структурах був значно підвищеним у період 0,5–2 год на 29 % ( $P < 0,05$ ). Після деякого зниження його через 6 год на 15 % наставала стабілізація показників. При цьому в гангліозних клітинах із 6 год до 2 діб оптична густина SS-груп була значно нижчою за контрольні значення.

У зоровій корі оптична густина дисульфідів мало відрізнялася від контролю. Лише у перші два терміни нейрони зорової кори характеризувались її зниженням у середньому на 17 % ( $P < 0,05$ ). Глія у цей період була відзначена незначним підвищенням рівня дисульфідів на 16 % ( $P < 0,05$ ).

## Висновки

1. За результатами експерименту можна зробити висновок, що попередня лікарська сти-

муляція підвищує метаболічну стійкість до шкідливого впливу монобромацетату. Ступінь стійкості залежить від використаного метаболічного засобу.

2. Вплив малими дозами альтеранту лише незначною мірою послаблював стимулювальний ефект метаболічних засобів, однак не викликав ніяких токсичних проявів.

3. Якщо мінімальна доза інгібітора викликала оборотні цитохімічні зміни білкових тіолів, то при її збільшенні такого не спостерігалось.

4. На відміну від великих доз інгібітора, де виявляється їхня токсична дія, при малих концентраціях наочно спостерігається закономірність переходу трофічного матеріалу з глії в нейрон. Про це свідчить і зменшення концентрації тіолів у перинейрональній глії у разі збільшення його в нейронах (незалежно від використаного препарату).

5. Протекторна дія мареполімієлу при використанні монобромацетату була більш тривалою, ніж цистеїну й аскорбінової кислоти.

6. Для вітамінного препарату вираженість змін була значнішою, ніж для цистеїну і мареполімієлу.

7. Якщо враховувати, що порушення життєдіяльності клітин може виникнути внаслідок інтоксикації або зміни регуляції середовища організму, то досліджувані лікарські препарати виконують позитивну детоксикаційну функцію, яка полягає в знешкодженні токсичних речовин. У здійсненні цього, можливо, важливу роль відіграють ендogenous тіоли та інші речовини, що виконують захисну функцію й інтенсивно нагромаджуються в тканинах після фармакологічного впливу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experim and other scientific purposes // Conventions of Europe.* — Strasbourg, 1986. — 53 p.

2. *The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium / Yasuhiro Ikeda, Yoshikazu Yonemitsu, Mitsuhiko Onimaru [et al.]*

*// Experimental eye research.* — 2006. — Vol. 83, N 5. — P. 1031-1040.

3. *Kowluru R. A. Anti-Oxidants and Diabetic Retinopathy / R. A. Kowluru, M. Kanwar // 7th International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics [Електронний ресурс].* — Hungary, Budapest, Febr. 28 – March 2, 2008. — Режим доступу : <http://www.monduzzi.com/proceedings/moreinfo/20080228.htm>.

4. *Изменения физиологической регенерации переднего эпителия роговицы под влиянием световой и ионизирующей радиации / В. В. Вит, Е. В. Мальцев, К. П. Павлюченко [и др.] // Архив клінічної та експериментальної медицини.* — 2002. — Т. 11, № 3. — С. 364-367.

5. *Васюта В. А. Возможности видоизменения функционально-морфологического статуса зорового анализатора под действием «Трофину» при метаноловой интоксикации : автореф. дис. ... канд. мед. наук : спец. 14.01.18 / В. А. Васюта ; МЗ України, Київ, Мед. акад. післядиплом. освіти ім. П. Л. Шупика.* — К. : Б. в., 2005. — 19 с.

6. *Галанц С. Медико-биологическая статистика / Стентон Галанц ; пер. с англ. : Ю. А. Данилова, Н. Е. Бузикашвили, Д. В. Самойлова.* — М. : Практика, 1999. — 459 с.

7. *Джеймс Ф. Вэндер. Секреты офтальмологии / Ф. Вэндер Джеймс, А. Голт Дженис.* — М., 2005. — 464 с.

8. *Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова.* — К. : Авіценна, 2001. — 528 с.

9. *Карушин О. И. Современные методы лечения атрофии зрительного нерва : автореф. дис. ... канд. мед. наук : спец. 14.01.28 / О. И. Карушин.* — Уфа, 2005. — 17 с.

10. *Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия / Д. Кисели ; науч. ред. Д. Ромханы ; пер. с венг. : Г. Дьенеш, И. Пушкаш.* — Будапешт : Изд-во АН Венгрии, 1962. — 400 с.

11. *Природные антиоксиданты (биотехнологические, биологические и медицинские аспекты) / Л. В. Кричковская, Г. В. Донченко, С. И. Чернышов [и др.].* — Х. : Модель Вселенной, 2001. — 376 с.

12. *Можаренков В. П. Медикаментозные поражения органа зрения (обзор) / В. П. Можаренков, Г. Л. Прокофьев // Вестник офтальмологии.* — 1992. — Т. 108, № 1. — С. 46-48.

13. *Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс.* — М. : Иностранная литература, 1962. — 962 с.

14. *Ряднова В. В. Антиоксиданты в комплексной терапии диабетических ангиоретинопатий (клініко-експериментальне дослідження) : автореф. дис. ... канд. мед. наук : спец. 14.01.28 / В. В. Ряднова ; Ін-т фармакол. та токсикол. АМН України.* — К., 2003. — 20 с.

