

Експериментальні дослідження

УДК 616.4-008.6:615.217:547.419.5

Нейродегенеративні зміни сітківки щурів з хронічною формою епілептичного синдрому за умови застосування ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманату (МІГУ-4)

Н. Аль-Надаві, асистент; В. Й. Кресюн, д-р мед. наук, професор

Одеський національний
медичний університет
Одеса (Україна)

Актуальність. Епілепсія супроводжується нейродегенеративними змінами в тому числі з боку сітківки. Визначення механізмів порушень з боку сітківки за умови моделювання експериментального епілептичного синдрому дає змогу розробляти нові підходи до фармакологічної корекції зору.

Метою роботи є вивчення морфологічних характеристик сітківки ока щурів із хронічним епілептичним синдромом, викликаним уведеннями пентилентетразолу (ПТЗ), а також особливостей морфології сітківки за умови застосування ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманату (МІГУ-4).

Матеріал і методи. У щурів лінії Вістар викликали хронічний епілептичний синдром уведеннями ПТЗ в дозі 35,0 мг/кг, в/очер протягом трьох тижнів. Щурам із розвиненими генералізованими судомами протягом чотирьох тижнів вводили МІГУ-4 в дозах 5,0 і 25,0 мг/кг, в/очер, після чого здійснювали евтаназію та досліджували морфологічні характеристики зрізів сітківки ока, забарвлених гематоксилин-еозиноом.

Результати. Визначено, що в щурів із розвиненим кіндлінгом у гангліонарному шарі щільність клітин була у 2,14 раза нижчою ($p < 0,05$), у внутрішньому та зовнішньому ядерних шарах на 41,0% і на 19,0% відповідно меншою ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою. На тлі застосування МІГУ-4 (25,0 мг/кг, в/очер) щільність клітин гангліонарного шару на 38,0% перевищувала відповідний показник у групі контролю ($p < 0,05$). Щільність клітин у внутрішньому ядерному шарі перевищувала таку в контрольній групі на 30,5% ($p < 0,05$). У зовнішньому ядерному шарі щільність клітин не відрізнялася статистично від контрольної в групах із застосуванням МІГУ-4 в обох досліджуваних дозах (5,0 і 25,0 мг/кг, в/очер, $p > 0,05$).

Висновок. Модель ПТЗ-індукований хронічний епілептичний синдром супроводжується нейродегенеративними змінами сітківки ока. Курсове застосування МІГУ-4 викликає нейропротекторну дію на моделі ПТЗ-індукованої ретинопатії.

Ключові слова:

пентилентетразоловий кіндлінг, хронічний епілептичний синдром, ретинопатія, ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманату (МІГУ-4), нейропротекція

Актуальність. Епілепсія – хронічне захворювання з періодичними судомними нападами, які спричиняють глибокі порушення з боку нейромедіаторних систем, біоелектрогенезу, синтезу та метаболізму макромолекулярних сполук мозку. Одним із характерних проявів захворювання є нейродегенеративні зміни, які в тому числі виникають у сітківці [11, 14].

В основі подібних змін з боку нервової тканини є виникнення нейроімунного запалення [6], що дає змогу розглядати протизапальні засоби як перспективні щодо запобігання нейродегенеративним змінам при епілепсії.

Останнім часом встановлено протизапальну активність органічних сполук, що містять германій [7]. Також препарати германію чинять антиоксидантну дію, завдяки чому запобігають дегенеративним змінам клітин [5, 12]. Для сполук германію з оксіетилідендифосфоновією кислотою є характерною низька токсичність,

висока біологічна активність, клінічна ефективність похідних, які застосовують з метою регуляції мінерального обміну, протипухлинного лікування, детоксикації, а також протизапальної дії. Визначено, що ніацин-оксіетилідендифосфанатогерманат (МІГУ-4) швидко надходить у системний кровотік, є добре доступним до тканин організму, чинить антиоксидантну, гепатопротекторну дію, а також знижує збудливість структур мозку [1–3].

Модель хронічного епілептичного синдрому – ПТЗ-кіндлінг – супроводжується виразними нейродегенеративними порушеннями в структурах мозку [9, 13]. До останнього часу не вивчали стан сітківки за умови ПТЗ.

Тому метою роботи є вивчення морфологічних характеристик сітківки ока щурів із хронічним епілеп-

тичним синдромом, модельованим шляхом відтворення ПТЗ-індукованого кіндлінгу, а також особливостей морфології сітківки за умов застосування МІГУ-4.

Матеріал і методи дослідження

Експериментальні тварини

Дослідження проводили на 36 самцях щурів лінії Вістар віком 2–3 місяці, масою 180–220 г. Тварин утримували за стандартних умов температури ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), вологості (60%) і 12-годинного циклу зміни освітлення з вільним доступом до води та їжі. Усі процедури проводили відповідно до рекомендацій Керівництва з догляду та використання лабораторних тварин, прийнятого Національними інститутами здоров'я (Бетесда, США), і Гельсінської декларації, а також з дозволу комісії з біоетики Одеського національного медичного університету (протокол від 14.03.2018 № 3).

Модель ПТЗ-викликаного кіндлінгу й уведення МІГУ-4

Модель епілепсії, викликані пентилентетразолом (ПТЗ), була індукована, як описано раніше [15]. ПТЗ (P6500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) розчиняли в 0,9% розчині NaCl ex tempore й вводили внутрішньочеревно (в/очер) у дозі 35,0 мг/кг протягом 21 доби ($n=27$). У всіх включених до спостережень щурів після кожного з трьох останніх уведень ПТЗ спостерігали судоми тяжкістю 4–5 балів. Щурам групи контролю ($n=9$) вводили в/очер 0,9% фізіологічний розчин NaCl.

Після кожної ін'єкції щурів поміщали наодинці в ізольовану прозору клітку з оргскла й оцінювали тяжкість судом протягом 30 хв. за шестибальною шкалою [15]. Тяжкість судом оцінювали за такою шкалою: 0 – відсутність судом; 1 – завмирання, тремор і міоклонічні посмикування окремих груп м'язів; 2 – клонічні судоми всього тіла; 3 – клонічні нападові судоми передніх кінцівок тіла з підведеннями на задні лапи; 4 – генералізовані клоніко-тонічні судоми з утратою рівноваги та падіннями; 5 – повторні напади, як на 4 стадії, або летальний кінець у результаті нападів.

З огляду на тривалість періоду виникнення змін з боку нервової тканини внаслідок нейроімунного запалення [8], уведення МІГУ-4 здійснювали у вигляді чотириденного курсу з наступної доби після останнього застосування ПТЗ. Здійснювали в/очер уведення МІГУ-4 в 0,9% фізіологічному розчині NaCl щодобово в дозах 5,0 мг/кг ($n=9$) і 25,0 мг/кг ($n=9$). Щурам групи контролю – інтактні щури ($n=9$) і групі щурів з кіндлінгом ($n=9$) здійснювали в/очер уведення аналогічного об'єму 0,9% фізіологічного розчину NaCl. Таким чином, МІГУ-4 вводили двом групам щурів ($n=18$) і ще дві групи (інтактні та кіндлінгові щури) слугували як відповідні групи контролю.

Гістологічні дослідження

Евтаназію та енуклеацію здійснювали наступного дня після останнього введення МІГУ-4 за допомогою введення пентобарбіталу в дозі 100,0 мг/кг, в/очер. Після енуклеації очне яблуко розміщували в розчині, який

містив 75% пікринову кислоту, 25% формаліну, 5% оцтову кислоту. Після фіксації видаляли рогівку, внутрішньоочну рідину, кришталік, склоподібне тіло, а залишені тканини дегідрували за допомогою 70–100% етилового спирту, після чого їх парафінізували та виготовляли зрізи товщиною 5 мкм. Зрізи сітківки виготовляли шляхом розсічення її в сагітальному напрямку у верхній частині очного яблука, яка прилягала до носових кісток, починаючи з точки, що знаходилася на 1 мм вище краю оптичного диска [4, 10]. Виготовлені так зрізи забарвлювали гематоксилін-еозинном і досліджували за допомогою світлового мікроскопа. Фотографували цифровою фотокамерою NikonDXM 1200 (Токіо, Японія), суміщеною з EclipseNikonE-800 мікроскопом. Усі фото виконували в прямокутному форматі 1280×960 пікселів за допомогою об'єктива $40\times$ і $10\times$ для підрахунку клітин. Клітини підраховували на цифрових фотознімках як вручну, так і використовуючи модулі програмних засобів ImageJ, які знаходяться у відкритому доступі. Результати підрахунків подавали у вигляді кількості клітин на $\text{мм}^2 + \text{SEM}$.

Результати досліджень обробляли статистично з використанням методу ANOVA й тесту Newman-Keuls за допомогою програми «Primer Biostatistics», США, яка знаходиться у вільному доступі. Рівень достовірності статистичних відмінностей приймали при $p < 0,05$, а результати подавали у вигляді середньої величини та її статистичної похибки ($M \pm \text{SEM}$).

Результати дослідження

Поведінкові характеристики кіндлінгових судом

Судоми починалися після другої-четвертої ін'єкції й мали прогресуючий розвиток протягом наступних 2–3 уведень ПТЗ до рівня міоклонусів м'язів тулуба. Наступні 4–9 уведень викликали підведення щурів на задні кінцівки з клонічними судомами передніх кінцівок щурів. Генералізовані клоніко-тонічні судомні напади виникали в піддослідних тварин після 8–17-ї ін'єкції ПТЗ. Під час нападів щури втрачали рівновагу, падали набік і демонстрували післянападову депресію. Протягом тритижневого щодобового введення ПТЗ спостерігалось характерне посилення їх тяжкості – до $4,3 \pm 0,2$ балів (рис. 1). Щури, включені до подальшого дослідження, демонстрували розвиток генералізованих судомних нападів у відповідь на кожне з трьох останніх уведень епілептогену.

Гістологічні характеристики

Під час морфологічних досліджень сітківки гістологічні порушення оцінювали за показниками зниження кількості клітин, вакуолізацією цитоплазми, наявністю набряку, дезорганізації та пікнотичних порушень з боку ядра клітини. Указані прояви відсутні в гістологічних препаратах щурів групи контролю (рис. 2) і виразні в щурів із розвиненими кіндлінговими судомами (рис. 2). Характерні порушення виявлялися у вигляді дезорганізації, вакуолізації цитоплазми клітин і пікнотичних змін у гангліонарному та внутрішньому ядерно-

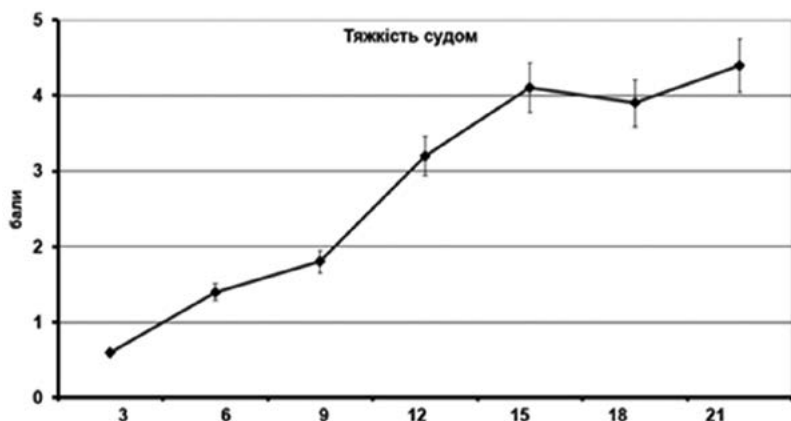


Рис. 1. Динаміка тяжкості судом протягом розвитку пентилентетразол-індукованого кіндлінгу.

Позначення: по вісі абсцис – період спостереження (доби); по вісі ординат – досліджувані показники в балах. Результати представлені як $M \pm SEM$.

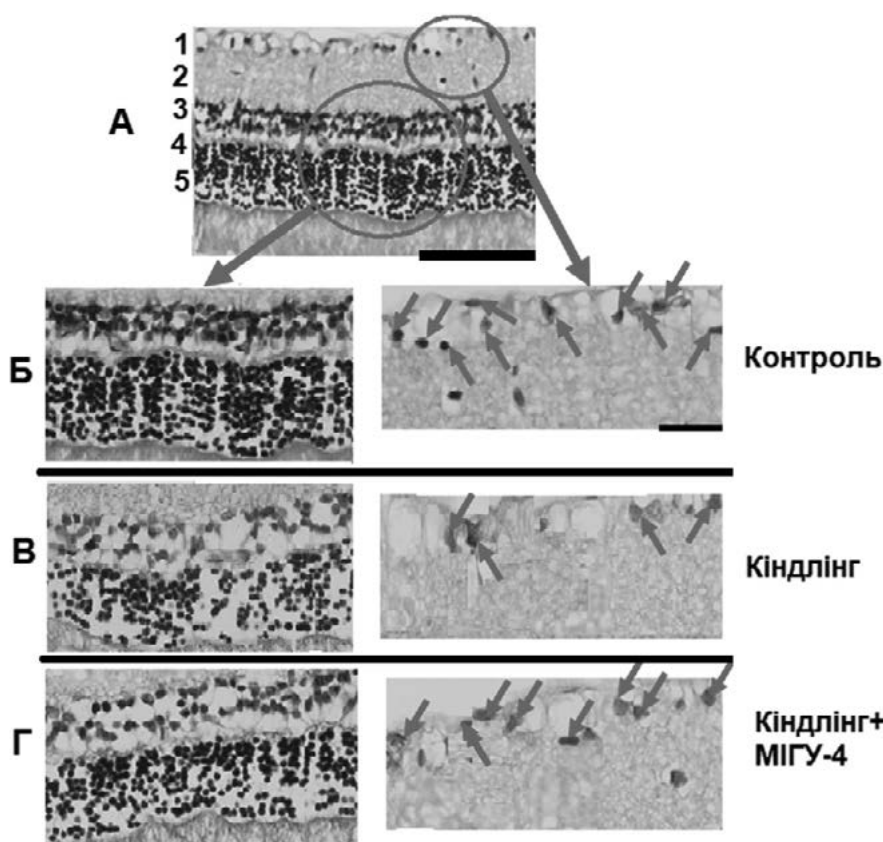


Рис. 2. Сітківка щурів із ПТЗ-індукованим кіндлінгом за умови застосування МІГУ-4. Забарвлення гематоксилін-еозин.

Позначки: А – контроль: 1– гангліонарний шар, 2 – внутрішній плексіформний шар, 3 – внутрішній ядерний шар, 4 – зовнішній плексіформний шар, 5 – зовнішній ядерний шар. Б – контроль (щур з уведенням 0,9% фізіологічного розчину NaCl), В – кіндлінг (щур з уведенням пентилентетразолу), Г – кіндлінг на тлі застосування МІГУ-4 (25,0 мг/кг в/очер). Стрілками позначено гангліонарні клітини, які брали до уваги під час визначення досліджуваних показників.

Горизонтальна лінія в нижньому куті справа на «А» та «Б» – 50 мкм.

му шарах. У групі щурів, яким застосовували МІГУ-4 в дозі 25,0 мг/кг в/очер, указані порушення були менш виразними (рис. 2, Г).

Кількісна оцінка клітин сітківки свідчила, що в гангліонарному шарі в щурів із розвиненим кіндлінгом щільність клітин була у 2,14 раза нижчою, ніж у групі контролю ($p < 0,05$) (рис. 3). На тлі застосування МІГУ-4 в меншій дозі (5,0 мг/кг в/очер) досліджуваний показник залишався нижчим, ніж у контрольній групі, на 38,5% ($p < 0,05$), а на тлі застосування МІГУ-4 в дозі 25,0 мг/кг в/очер відмінності становили 24,8% ($p < 0,05$) (рис. 3). Водночас щільність клітин гангліонарного шару достовірно (на 38,0%) перевищувала відповідний показник у групі контролю кіндлінгових щурів ($p < 0,05$) (рис. 3).

У внутрішньому ядерному шарі кіндлінгових щурів спостерігали зниження щільності клітин на 41,0% порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$) (рис. 4). На тлі застосування МІГУ-4 в дозі 5,0 мг/кг в/очер досліджуваний показник залишався нижчим, ніж у групі контролю на 36,0% ($p < 0,05$), тоді як на тлі застосування МІГУ-4 в дозі 25,0 мг/кг в/очер щільність клітин була меншою на 15,3% ($p > 0,05$) (рис. 4). При цьому досліджуваний показник перевищував такий у групі кіндлінгових щурів на 30,5% ($p < 0,05$) (рис. 4).

У зовнішньому ядерному шарі в щурів із розвиненим кіндлінгом спостерігали зниження кількості клітин порівняно з таким у групі контролю на 19,0% ($p < 0,05$) (рис. 5). У групах кіндлінгових щурів, яким застосовували МІГУ-4 в обох дозах, досліджуваний показник не

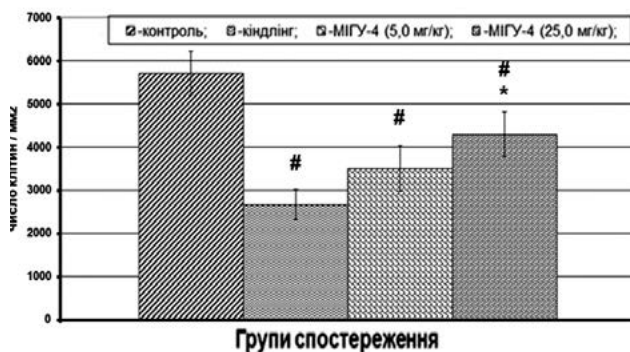


Рис. 3. Динаміка зміни кількості клітин у гангліонарному шарі сітківки щурів із розвиненим ПТЗ-індукованим кіндлінгом за умови застосування МІГУ-4

Позначки: # – P – рівень значущості відмінностей порівняно з контрольною групою <math><0,05</math>; * – P – рівень значущості відмінностей порівняно зі щурами з розвиненим кіндлінгом <math><0,05</math> (ANOVA+ Newman-Keuls тест).

відрізнявся статистично порівняно з групою контролю ($p>0,05$) (рис. 5).

У внутрішньому ядерному шарі кіндлінгових щурів спостерігали зниження щільності клітин на 41,0% порівняно з контрольною групою (<math>p<0,05</math>) (рис. 4). На тлі застосування МІГУ-4 в дозі 5,0 мг/кг в/очер досліджуваний показник залишався нижчим, ніж у групі контролю на 36,0% (<math>P<0,05</math>), тоді як на тлі застосування МІГУ-4 в дозі 25,0 мг/кг в/очер щільність клітин була меншою на 15,3% ($p>0,05$) (рис. 4). При цьому досліджуваний показник перевищував такий у групі кіндлінгових щурів на 30,5% (<math>p<0,05</math>) (рис. 4).

У зовнішньому ядерному шарі в щурів із розвиненим кіндлінгом спостерігали зниження кількості клітин порівняно з таким у групі контролю на 19,0% (<math>p<0,05</math>) (рис. 5). У групі щурів, яким застосовували МІГУ-4 в дозі 5,0 мг/кг в/очер, досліджуваний показник залишався нижчим порівняно з групою контролю на 14,7% ($p>0,05$), тоді як у групі щурів, яким МІГУ-4 вводили в дозі 25,0 мг/кг в/очер, відмінності становили 10,5% ($p>0,05$) (рис. 5).

Обговорення

Отже, отримані результати свідчать про формування підвищеної судомної готовності щурів до конвульсивної дії пентилентетразолу в процесі його введення в дозах, які спочатку не викликали судом. Подібна модель використовується в експериментальних дослідженнях як найбільш адекватна щодо відтворення основних клінічних характеристик епілепсії [15]. На відміну від гострих форм епілептичного синдрому, що викликають одноразовим застосуванням епілептогенних чинників, кіндлінгова модель дає змогу вивчати патогенез хронічної епілепсії, в основі якої можуть знаходитися нейродегенеративні стійкі зміни в тканині головного мозку [9]. До останнього часу це припущення підтверджували дослідження структур саме головного

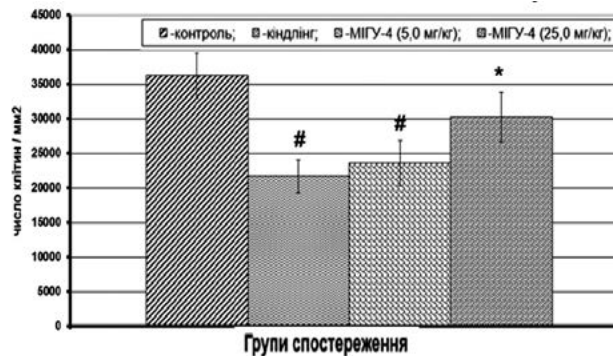


Рис. 4. Динаміка зміни кількості клітин внутрішнього ядерного шару сітківки в кіндлінгових щурах за умови застосування МІГУ-4

Позначки: # – P – рівень значущості відмінностей порівняно з контрольною групою <math><0,05</math> і * – P – порівняно з групою щурів із розвиненим кіндлінгом <math><0,05</math> (ANOVA+ Newman-Keuls тест).

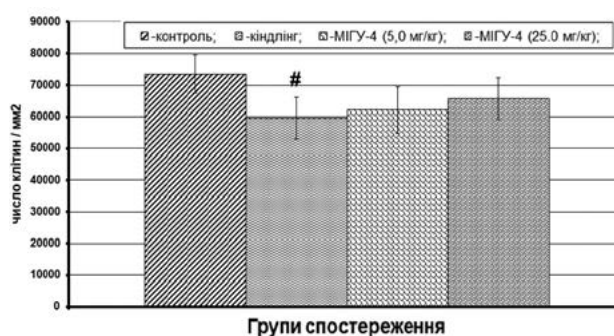


Рис. 5. Динаміка зміни кількості клітин зовнішнього ядерного шару сітківки в кіндлінгових щурах за умови застосування МІГУ-4.

Позначки: # – <math>P<0,05</math> порівняно з контрольною групою (ANOVA+ Newman-Keuls тест).

мозку, тоді як морфофункціональний стан сітківки ока залишався поза увагою.

Наведені результати засвідчують, що модель хронічної епілептичної активності, яка викликана застосуванням ПТЗ, у щурів супроводжується дегенеративними змінами нейронів сітківки. Одним із можливих механізмів подібних порушень можуть бути системні нейроімунні зміни, що полягають в активації мікроглії, зростанні вмісту прозапальних цитокинів, а також умісту вільних радикалів у тканині сітківки [10]. Можливою є причетність накопичення збуджуючих амінокислот у зоні запалення [6]. Подібні результати збігаються з даними дослідників [8], які вивчали морфологічні особливості сітківки щурів за умови моделювання епілептичного статусу. Автори зазначають, що виразні нейродегенеративні зміни з боку сітківки можна спостерігати в пізні терміни з моменту виникнення судом. Морфологічним змінам передувала активація мікроглії, яка є типовою для виникнення нейроімунного запалення й найбільш виразно виявлялася у внутрішніх шарах сітківки.

У даному дослідженні більш виразними були дегенеративні зміни з боку внутрішнього ядерного шару та шару гангліонарних клітин у порівнянні до стрептозотозин-індукованої діабетичної ретинопатії, для якої дегенеративні зміни превалюють у зовнішньому ядерному шарі [4]. Отже, за морфологічними ознаками епілептогенна нейродегенерація сітківки має відмінності від експериментальної стрептозотозин-індукованої діабетичної ретинопатії.

З огляду на наявність нікотинової кислоти в складі МІГУ-4 та її вазодилаторні властивості, можливим компонентом нейропротекторного впливу препарату, крім зазначених антиоксидантних та протизапальних ефектів, може бути усунення ішемії сітківки під час судомних нападів.

Варто підкреслити, що виявлена нейропротекторна ефективність МІГУ-4 дозволяє припустити його ефективність для запобігання нейродегенеративних змін як в сітківці, так і в структурах мозку.

Висновки

1. Формування моделі хронічного епілептичного синдрому шляхом відтворення ПТЗ-індукованого кіндлінгу викликає нейродегенеративні зміни з боку нейронів сітківки ока, які є найбільш виразними у внутрішньому ядерному та гангліонарному шарах.

2. Застосування ніацин-оксіетилідендифосфонато-германату (МІГУ-4) доза-залежним чином запобігає виникненню нейродегенеративних порушень з боку сітківки ока в щурів із хронічним епілептичним синдромом.

Перспективи подальших наукових досліджень

Передбачається подальше вивчення нейрофізіологічних показників – зорових викликаних потенціалів – як маркера ретинопатії, а також нейропротекторного впливу МІГУ-4 на структури мозку за умови моделювання ПТЗ-індукованого кіндлінгу.

Література

1. Волощенко ДБ, Кашенко ОА, Годован ВВ, Шандра ОА. Вплив похідних дифосфонату германію з нікотинамідом, нікотиновою кислотою та магнієм на ригідність м'язів, тремор і салівацію у щурів та мишей. Одеський мед. журнал. 2005;4 (90):21-4.
2. Годован ВВ, Кресюн ВЙ. Стан системи антиоксидантного захисту клітини при галактозаміновому гепатиті та застосуванні похідних оксіетилідендифосфонатогерманатів (Повідомлення 1). Одеський мед. журнал. 2007а;4 (102):36-41.
3. Годован ВВ, Кресюн ВЙ. Стан системи антиоксидантного захисту клітини при галактозаміновому гепатиті та застосуванні похідних оксіетилідендифосфонатогерманатів (Повідомлення 2). Одеський мед. журнал. 2007б;5(103):С. 5-10.
4. Кресюн ВВ. Нейродегенеративні зміни сітківки ока щурів зі стрептозотозинним діабетом за різних умов експериментального лікування. Запорізький мед. журнал. 2014;4:21-5.
5. Wada T, Hanyu T, Nozaki K, et al. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. Biol. Pharm. Bull. 2018;41(5):749-53.
6. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien T. Epilepsy. NatRev-DisPrimers. 2018;4. ArticleID 18024.
7. Cho JM, Chae J, Jeong SR, et al. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. PLoS One. 2020;15(10). Article ID e0240358.
8. Ahl M, Avdic U, Skoug C, et al. Immune response in the eye following epileptic seizures. Neuroinflamm. 2016;13:155.
9. Jaiswal G, Kumar P. Neuroprotective role of apocynin against pentylene tetrazole kindling epilepsy and associated comorbidities in mice by suppression of ROS/RNS. Behav. Brain Res. 2022;419.
10. Kresyun NV, Godlevskii LS. Superoxide dismutase and catalase activities in the retina during experimental diabetes and electric stimulation of the paleocerebellar cortex. Bull. Exp. Biol. Med. 2014;158(2):206-8.
11. Bayraktar BN, Titiz AP, Bilen S, et al. Optical coherence tomography and neurodegeneration in epilepsy. Eur. J. Ophthalmol. 2021;31(1):252-7..
12. Takeda T, Doiyama S, Azumiet J, et al. Organogermanium suppresses cell death due to oxidative stress in normal human dermal fibroblasts. Sci Rep. 2019;9. Article ID 13637.
13. El-Megiri N, Mostafa YM, Ahmed A, et al. Pioglitazone ameliorates hippocampal neurodegeneration, disturbances in glucose metabolism and AKT/mTOR signaling pathways in pentylene tetrazole-kindled mice. Pharmaceuticals. 2022;5:1113.
14. Hazirovan D, Duman M, Guler SK, et al. Retinal ganglion cell complex and visual evoked potentials in levetiracetam treatment. Cutan. Ocul. Toxicol. 2020;39(3):237-43.
15. Shandra AA, Godlevsky LS. Antiepileptic effects of cerebellar nucleus dentatus electrical stimulation under different conditions of brain epileptisation. Indian J Exp Biol. 1990;28(2):158-61.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Конфлікт інтересів. Автори засвідчують про відсутність конфліктів інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Джерела підтримки: Дослідження проведено за фінансової підтримки Міністерства охорони здоров'я України НДР «Підвищення ефективності контролю епілептичної активності застосуванням фармакологічних препаратів та неінвазивного подразнення структур мозку» (№ державної реєстрації 0121U114510).

Надійшла 23.01.2023