

УДК 615.384:616.831-005.4-001.6

А.І. СЕМЕНЕНКО<sup>1</sup>, О.А. ХОДАКІВСЬКИЙ<sup>1</sup>, І.Л. ЧЕРЕШНЮК<sup>1</sup>,  
Б.О. КОНДРАЦЬКИЙ<sup>2</sup>, Ю.Ю. КОБЕЛЯЦЬКИЙ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

<sup>2</sup>ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини  
НАМН України", м. Львів

<sup>3</sup>ДУ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України"

## Вплив інфузійних розчинів на фрагментацію ДНК клітин соматосенсорної кори при ішемії-реперфузії головного мозку у щурів

Сьогодні одним із небагатьох лікувальних заходів при гострому порушенні мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом, ефективність якого доведена з позицій доказової медицини, є тромболітична терапія [6]. За даними літератури [7], реперфузія при ГПМК найбільш ефективна у перші хвилини розвитку судинної катастрофи та в межах наступних трьох годин. У подальшому при її застосуванні значно зростає ризик не тільки реперфузійного пошкодження, а й геморагічних ускладнень. Беручи до уваги складність діагностики та проведення реканалізації, стає очевидним, що успішна реперфузійна терапія можлива у небагатьох випадках і лише у великих спеціалізованих клініках [11].

З'ясування того, який вид клітинної смерті переважає при розвитку постреперфузійних пошкоджень головного мозку має важливе практичне значення для розробки нових методів патогенетичної терапії інсульту, оскільки регенераторний потенціал нейронів різко обмежений і втрата навіть частини клітин може закінчитись фатально [1, 12, 13]. Частка некротичної та апоптотичної смерті нейронів у загальній масі ушкодженої нервової тканини доволі варіабельна і залежить від багатьох умов. Загибель клітини шляхом апоптозу не супроводжується розвитком запалення і цілісність мембрани не порушується. Клітина втрачає більшу частину цитоплазми з подальшим утворенням апоптотичних тілець, котрі згодом фагоцитуються. Саме тому апоптотичну загибель нейронів вважають "меншим злом" для головного мозку, хоча загальна кількість клітин й зменшується [14]. Беручи до уваги складність методик оцінки та швидку елімінацію апоптотичних клітин, визначення їх сумарної частки в ішемізованій ділянці головного мозку є непростим завданням [4].

Серед лікувальних заходів, що знижують імовірність розвитку ішемії головного мозку при ГПМК, великий інтерес приділяють впливу на центральну гемодинаміку. При цьому важливе місце посідає інфузійна терапія, вибір якої при захворюваннях і ушкодженнях головного мозку є однією з найбільш складних проблем в комплексі консервативного лікування цих хворих [3]. Метою гемодилуції при ішемічному інсульті є покращення мікроциркуляції в зоні ішемії, відкриття колатералів, підвищення церебрального перфузійного тиску та зниження в'язкості крові [2, 5, 8]. З огляду на наведене вище, значний інтерес представляє дослідження впливу окремої курсової терапії інфузійними розчинами різного складу на апоптоз клітин соматосенсорної кори головного мозку у щурів.

Мета роботи – на моделі ішемічного постреперфузійного пошкодження головного мозку у щурів охарактеризувати вплив колоїдно-гіперосмолярного розчину *HAES-LX-5%* (зареєстрований в Україні

в 2013 р. під назвою “Гекотон”), колоїдно-ізоосмолярного розчину волювен та ізоосмолярного 0,9 %-го розчину NaCl на фрагментацію ДНК (апоптоз) клітин соматосенсорної кори головного мозку. Перелічені дослідження є фрагментом комплексного вивчення впливу різних інфузійних розчинів на клітини головного мозку в стані ішемії.

**Матеріали та методи дослідження.** Досліди проведено на 35 білих щурах-самцях масою 160...170 г, які перебували у стандартних умовах віварію, з дотриманням етичних норм експериментальних досліджень згідно з “Загальними принципами роботи на тваринах”, затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.) та Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 26.02.2006 р. Експериментальну модель ішемії-реперфузії (ІР) створювали шляхом накладання кліпс на обидві внутрішні сонні артерії під пропофоловим наркозом (60 мг/кг) впродовж 20 хв [9, 10]. Тварин було поділено на п’ять груп. Інфузійні розчини 0,9% NaCl, HAES-LX-5% та волювен вводили внутрішньовенно у катетеризовану стегнову вену по 2,5 мл/кг двічі на день (5 мл/кг на добу). Перше введення проводили через 30 хв після ІР і далі щодоби через кожні 12 год впродовж чотирьох діб. До контрольних груп входили інтактні щурі та тварини з ІР без лікування.

Через 96 год після ІР і декапітації тварин вилучали частки соматосенсорної кори головного мозку для подальшої оцінки фрагментації ДНК у клітинах. Дослідження виконували методом проточної цитометрії на базі науково-дослідного центру ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Для отримання ядерних суспензій використовували спеціальний розчин *CyStain DNA* фірми *Partec* (Німеччина) згідно з інструкцією виробника, а також одноразові фільтри *CellTrics* 50 мкм (*Partec*, Німеччина). Ядерні суспензії з часток соматосенсорної кори головного мозку щурів готували одразу після забору матеріалу та промивання холодним фосфатно-сольовим буфером рН=7,4 (*Sigma*) при температурі +(4–8) °С. Дослідження апоптозу проводили на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі “*Partec PAS*» фірми *Partec* (Німеччина). Для збудження флуоресценції мітки ядерної ДНК – діамідинофенілндола – використовували ультрафіолетову лампу. З кожного зразка ядерної суспензії проводили аналіз 10 тис. подій. Протоковий аналіз фрагментації ДНК виконували засобами програмного забезпечення *FloMax* (фірма *Partec*, Німеччина) шляхом виділення *Sub-G1* ділянки на ДНК-гістограмах [10].

Отримані результати обробляли за допомогою статистичної програми *StatPlus 2009* з використанням парного критерію Вілкоксона. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Проведене дослідження свідчить, що у групі контрольної патології (ІР без лікування) показник фрагментації ДНК в ядрах клітин соматосенсорної кори головного мозку через 96 год після моделювання церебральної 20-хвилинної ішемії-реперфузії був вірогідно вищим у 3,4 разу або на +241% порівняно з групою інтактних щурів (див. таблицю). Це свідчить про процес інтенсивного формування вогнища ішемічної напівтіні (пенумбри) саме за рахунок нейронів, які перебувають у стані апоптотичної смерті.

Після курсового введення (впродовж чотирьох діб) щурам у постреперфузійний період 0,9% розчину NaCl в ядрах клітин соматосенсорної кори їх головного мозку зафіксували менші значення показників інтервалу *Sub-G0G1* відносно аналогічного показника тварин контрольної групи в середньому на 16,1%. Це свідчить про деяке зменшення явищ апоптотичного пошкодження клітин соматосенсорної кори головного мозку щурів на тлі лікування ГПМК 0,9% розчином NaCl у дозі по 2,5 мл/кг двічі на день.

**Вплив інфузійних розчинів на фрагментацію ДНК (*SUB-G0G1*) ядер клітин соматосенсорної кори через 96 год після ішемії-реперфузії головного мозку щурів ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )**

Умови досліджу	Фрагментація ДНК, %
Інтактні щури	7,58±0,50
ІР без лікування (контрольна патологія)	25,85±1,83* (+241%)
ІР+ 0,9% NaCl	21,68±1,13* [-16,1%]
ІР + волювен	16,45±0,82*#^ [-36,3%],{-24,1%}
ІР + HAES-LX-5%	13,48±0,68*#^° [-47,8%],{-37,8%}

Примітки: ІР – ішемія-реперфузія; \* –  $p < 0,05$  – відносно показника інтактних щурів; # –  $p < 0,05$  – відносно показника контрольної патології; ^ –  $p < 0,05$  – відносно терапії 0,9% розчином NaCl; ° –  $p < 0,05$  – відносно терапії волювеном; ( ) – відносно показника інтактних щурів; [ ] – відносно показника контрольної патології; { } – відносно терапії 0,9% розчином NaCl.

За зазначених умов застосування колоїдно-ізоосмолярного розчину волювену та колоїдно-гіперосмолярного розчину *HAES-LX-5%* мало виражену антиапоптотичну дію щодо контролю (ІР без лікування). Спостерігалось статистично достовірне зменшення фрагментації ДНК в ядрах клітин соматосенсорної кори головного мозку в досліджуваному періоді при застосуванні волювену на 36,3% та при застосуванні *HAES-LX-5%* на 47,8% (див. таблицю).

Порівнюючи вплив розчинів волювен та *HAES-LX-5%* з впливом 0,9% розчину NaCl, з'ясували, що на четверту добу спостереження інфузії *HAES-LX-5%* та волювен за антиапоптотичним ефектом переважали введення 0,9% розчину NaCl в середньому відповідно на 24,1 та 37,8% (в обох випадках  $p < 0,05$ ).

При порівнянні ефективності двох досліджуваних розчинів, що містять колоїдну основу, за показником фрагментації ДНК (*SUB-G0G1*) ядер клітин соматосенсорної кори у щурів з ІР встановлено, що терапія розчином *HAES-LX-5%* виявилась вірогідно кращою за інфузію волювену на 18,1% (13,48±0,68% проти 16,45±0,82%) ( $p < 0,05$ ).

Отримані дані є свідченням того, що інфузійна терапія при ГПМК призводить до гальмування процесів нейроапоптозу, що, очевидно, пояснюється покращенням кровообігу в зоні ішемії головного мозку внаслідок зменшення дегідратації та створення лікувальної гемодилуції. При цьому ефективність інфузійної терапії залежить від застосованого розчину: колоїдні розчини мали значно кращий ефект порівняно з кристалоїдним ізоосмотичним розчином.

**Висновки.** Постреперфузійний період модельного ішемічного інсульту у щурів супроводжується вірогідним зростанням відносно інтактних щурів рівня фрагментації ДНК у ядрах клітин соматосенсорної кори головного мозку на четверту добу експерименту в середньому у 3,4 разу. Лікувальне курсове введення розчинів волювену та *HAES-LX-5%* щурам із ГПМК чинило подібну за спрямованістю та силою антиапоптотичну дію відносно контролю, що проявлялось у зменшенні фрагментації ДНК в ядрах клітин соматосенсорної кори головного мозку в досліджуваному періоді в середньому відповідно на 36,3 та 47,8% ( $p < 0,05$ ). При цьому церебропротекторний ефект колоїдних розчинів волювен та *HAES-LX-5%* значно кращий від застосування 0,9% розчину NaCl ( $p < 0,05$ ). За антиапоптотичним ефектом в умовах постреперфузійного пошкодження головного мозку терапія розчином

HAES-LX-5% виявилась вірогідно кращою в середньому на 18,1% ( $p < 0,05$ ) за інфузію волювену. Для підтвердження отриманих даних та оцінки механізму дії різних інфузійних розчинів перспективним слід вважати дослідження з використанням специфічних маркерів ішемії головного мозку.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вплив діакамфу гідрохлориду на інтенсивність нейроапоптозу при експериментальному порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / В.В. Шведський, С.Ю. Штриголь, С.І. Мерзлікін, І.Л. Черешнюк // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 2. – С. 49–53 (*Influence of diacamph hydrochloride on neuroapoptosis intensity in experimental stroke on the background of diabetes / V. Shvedskyy, S. Shtrygol, S. Merzlikin, I. Chereshnyuk // Pharmacology and Drug Toxicology. – 2012. – № 2. – P. 49–53*). 2. Евзелман М.А. Ишемический инсульт. – Орел, 2003. – 294 с. (*Evzelman M. Ischemic stroke / M. Evzelman. – Orel, 2003. – 294 p.*). 3. Карзин А.В. Особенности инфузионной терапии при острых заболеваниях и повреждениях головного мозга, сопровождающихся внутримозговыми кровоизлияниями: дис. ... канд. мед. наук : 14.00.37; 14.00.28 / А.В. Карзин. – М., 2003. – 129 с. (*Karzin A. Features of infusion therapy for acute diseases and injuries of the brain, accompanied by intracranial hemorrhages: the dis. ... kand. of medical sciences: 14.00.37; 14.00.28 / A. Karzin. – M., 2003. – 129 p.*). 4. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В.Н. Манских // Бюл. сиб. медицины. – 2004. – № 1. – С. 63–70 (*Manskikh V. Morphological methods of verification and quantification of apoptosis / V. Manskikh // Bulletin of Siberian Medicine. – 2004. – № 1. – P. 63–70*). 5. Пасічник Г.П. Гемангіокорекція при гострому порушенні мозкового кровообігу з використанням препарату рефортан плюс / Г.П. Пасічник, Ю.М. Мартинчук, О.М. Яблунівський // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2010. – № 4. – С. 38–41 (*Pasichnyk G. Hemangiocorrection of acute cerebrovascular accident using the drug Refortan plus / G. Pasichnyk, Y. Martynchuk, O. Yablunovskyy // Pain, anesthesia and intensive care. – 2010. – № 4. – P. 38–41*). 6. Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками (2008) / Исполнительный комитет Европейской инсультной организации (ESO) и Авторский комитет ESO // Практична ангіологія. – 2008. – № 4. – С. 9–23 (*Recommendations for the management of patients with ischemic stroke and transient ischemic attacks (2008) / Executive Committee of the European Stroke Organization (ESO) and the Author's Committee ESO // Praktichna angiologiya. – 2008. – № 4. – P. 9–23*). 7. Соболева Е.Л. О возможных путях профилактики реперфузии при критических состояниях / Е.Л. Соболева, Ю.П. Орлов // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 13–16 (*Soboleva E. About the possible ways to prevent reperfusion injury in critical conditions / E. Soboleva, Y. Orlov // Sib. Med. Journ. – 2012. – № 1. – P. 13–16*). 8. Усенко Л.В. Ишемический инсульт глазами анестезиолога: современные подходы к интенсивной терапии / Л.В. Усенко, Л.А. Мальцева, А.В. Царев и др. – Днепропетровск, 2004. – 137 с. (*Usenko L. Ischemic stroke from view of anesthesiologist: modern approaches to the intensive care / L. Usenko, L. Maltseva, A. Tsarev et al. – Dnepropetrovsk, 2004. – 137 p.*). 9. Ходаковский А.А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели “ишемия-реперфузия”. Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А.А. Ходаковский, Л.И. Маринич, О.В. Багаури // Врач-аспирант. – 2013. – № 3 (58). – С. 69–76 (*Khodakovskiy A. Peculiarities of formation of postreperfusion neuronal damage – characteristic of model “ischemia-reperfusion”. Recent trends and perspectives of development of modern cerebroprotective treatment of ischemic stroke / A. Khodakovskiy, L. Marinich, O. Bagauri // Vrach-aspirant. – 2013. – № 3 (58). – P. 69–76*). 10. Ходаківський О.А. Дослідження впливу похідного адамантану адемола на фрагментацію ДНК ядер нейронів лобних часток кори за ішемії-реперфузії головного мозку у щурів / О.А. Ходаківський, І.Л. Черешнюк // Укр. вісн. психоневрол. – 2013. – Т. 21, № 1 (74). – С. 26–28 (*Khodakivskiy O. Study of the influence adamantane ademol derivatives on DNA fragmentation in the nuclei of neurons in the frontal lobe of the cortex by ischemia-reperfusion in the rat brain / O. Khodakivskiy, I. Chereshnyuk // Ukr. visn. psikhonevrol. – 2013. – Vol. 21, № 1 (74). – P. 26–28*). 11. Шведський В.В. Ефективність діакамфу гідрохлориду при експериментальному гострому порушенні мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету / В.В. Шведський, С.Ю. Штриголь, С.І. Мерзлікін // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2011. – Т. 11, вип. 3 (35). – С. 84–88 (*Shvedskyy V. Efficacy of diacamph hydrochloride in experimental acute cerebrovascular accident on the background of diabetes / V. Shvedskyy, S. Shtrygol, S. Merzlikin // Aktualni problemy suchasnoi medycyny: Visn. Ukr. med. stomatolog. akad. – 2011. – T. 11, № 3 (35). – P. 84–88*). 12. Knight R.

Cell death in disease: from 2010 onwards / R. Knight, G. Melino // Cell Death Dis. – 2011. – Vol. 2. – P. 202. 13. *Role of Apoptosis in disease* / B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano et al. // Aging. – 2012. – № 5, Vol. 4. – P. 330–349. 14. *Waring P. Apoptosis or programmed cell death* / P. Waring, F. Kos, A. Mullbacher // Med. Res. Rev. – 2008. – № 11. – P. 219–236.

Стаття надійшла до редколегії 01.04.14

**ВЛИЯНИЕ ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРОВ  
НА ФРАГМЕНТАЦИЮ ДНК КЛЕТОК СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ  
ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

**А.И. СЕМЕНЕНКО<sup>1</sup>, А.А. ХОДАКОВСКИЙ<sup>1</sup>, И.Л. ЧЕРЕШНЮК<sup>1</sup>,  
Б.А. КОНДРАЦКИЙ<sup>2</sup>, Ю.Ю. КОБЕЛЯЦКИЙ<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Винницкий национальный медицинский университет им. М.И. Пирогова

<sup>2</sup>ГУ “Институт патологии крови и трансфузионной медицины  
НАМН Украины”, г. Львов

<sup>3</sup>ГУ “Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины”

На модели острого нарушения мозгового кровообращения у крыс (20-минутная билатеральная окклюзия внутренних сонных артерий с последующей реперфузией) установлено, что лечение 0,9% раствором NaCl, волювеном или HAES-LX-5% по 2,5 мл/кг 2 раза в день (5 мл/кг в сутки) через 30 мин после ишемии-реперфузии и дальше ежесуточно через каждые 12 ч уменьшает количество апоптотического повреждения клеток соматосенсорной коры головного мозга. По способности тормозить процессы нейроапоптоза вследствие ишемично-реперфузионного повреждения головного мозга терапия волювеном или HAES-LX-5% была эффективнее инфузии 0,9% раствора NaCl. По величине антиапоптотического эффекта в условиях ишемии-реперфузии головного мозга лечение раствором HAES-LX-5% было достоверно более эффективным, чем волювеном.

**Ключевые слова:** ишемия-реперфузия головного мозга, 0,9% раствор NaCl, HAES-LX-5%, волювен, апоптоз.

**INFLUENCE OF INFUSION SOLUTIONS ON DNA FRAGMENTATION  
OF SOMATOSENSORY CORTEX CELLS DURING ISCHEMIA-  
REPERFUSION OF BRAIN IN RATS**

**A. SEMENENKO<sup>1</sup>, O. HODAKIVSKY<sup>1</sup>, I. CHERESHNYUK<sup>1</sup>,  
B. KONDRATSKY<sup>2</sup>, Yu. KOBELYATSKY<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya

<sup>2</sup> Institute of blood pathology and transfusion medicine of Ukraine, Lviv

<sup>3</sup> Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine

Among the therapeutic measures that reduce the likelihood of cerebral ischemia in stroke (CVA), a lot of interest is paid to the effect on central hemodynamics. Infusion therapy takes an important place, the choice of which in case of diseases and injuries of the brain is one of the most difficult problems in the complex conservative treatment of these patients.

The aim of this study was to characterize the effect of colloid hyperosmolar solution HAES-LX-5%, colloid solution Voluven and 0.9% NaCl solution on DNA fragmentation (apoptosis) of somatosensory cortex cells in model ischemic postreperfusion brain damage in rats.

**Materials and methods.** The experimental model of ischemia – reperfusion (IR) was created by clipping both internal carotid arteries for 20 min. Infusion solutions of 0.9% NaCl, HAES-LX-5% and Voluven were injected intravenously 2.5 ml/kg, 2 times/day (5 ml/kg per day). The first introduction was performed 30 min after IR and then daily every 12 hours for 4 days. The control group consisted of intact rats and animals with IR untreated. After 96 hours after IR and decapitation of animals the parts of somatosensory cortex were taken for further evaluation of DNA fragmentation in cells. The study was performed by flow cytometry.

Results. The study showed that in the control group (IR untreated) rate of DNA fragmentation in the nuclei of cells of somatosensory cortex after 96 hours after modeling 20 minutes of cerebral ischemia-reperfusion was significantly higher in 3.4 times in comparison with the group of intact rats.

Therapeutic introduction of solutions Voluven and HAES-LX-5% to rats with stroke produced a similar in direction and strength anti-apoptotic action relatively to control, manifested in the reduction of DNA fragmentation in the nuclei of cells of somatosensory cortex in the study on average by 36.3% and 47.8% ( $p<0.05$ ).

Comparing the influence of solutions Voluven and HAES-LX-5% with the influence of 0.9% NaCl solution it turned out that on the 4th day of the observation infusion of HAES-LX-5% and Voluven strength of anti-apoptotic effect dominated the administration of 0.9% solution NaCl on average by 24.1 and 37.8% (both  $p<0.05$ ).

When comparing the effectiveness of two test solution containing colloid base, in terms of DNA fragmentation (SUB-G0G1) nuclei somatosensory cortex in rats with IR found that treatment with a solution of HAES-LX-5% proved to be significantly better than the infusion Voluven 18.1% ( $13,48\pm 0,68\%$  to  $16,45\pm 0,82\%$ ) ( $p<0.05$ ).

The obtained data is evidence that infusion therapy for CVA leads to inhibition of neuroapoptosis processes which is obviously due to the improved blood circulation in the area of cerebral ischemia by reducing dehydration and the establishment of therapeutic hemodilution.

**Key words:** ischemia-reperfusion injury of the brain, normal saline, HAES-LX-5%, Voluven, apoptosis.