

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора Супрун Еліни Владиславівни на дисертаційну роботу на БЛОЇ Юлії Володимирівни «Фармакологічна модуляція HSP 70 – опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії», подану в спеціалізовану вчену раду Д.26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Дисертаційна робота Білої Юлії Володимирівни присвячена актуальній проблемі сучасної медицини та фармації – розробці нових ефективних медикаментозних засобів лікування порушень мозкового кровообігу з прямою антиоксидантною дією.

Актуальність теми. В останні десятиріччя спеціалістами більшості економічно-розвинених країн реєструється постійне зростання розповсюдженості цереброваскулярних захворювань, зокрема ішемічних інсультів. Актуальність їх пояснюється значною часткою в структурі захворюваності та летальності населення, тимчасової непрацездатності та інвалідності. Велика кількість етіологічних та патогенетичних факторів ішемічних уражень мозку диктує необхідність подальших досліджень механізмів розвитку церебральної ішемії, а також розробки методів її ефективної фармакологічної корекції.

Дослідженнями останніх десятиріч встановлено, що однією з ланок патогенезу нейродеструкції головного мозку є гіперпродукція активних форм кисню (супероксидрадикал, гідроксил-радикал, пероксинітрит-аніон, гіпохлорид-аніон тощо) біоенергетичними і нейрохімічними системами клітини, що призводить до окислювальної модифікації і деструкції білків, ліпідів і нуклеїнових кислот. Первинні засоби корекції нейродеструкції головного мозку (антиоксиданти та енерготропи) використовують без достатніх знань про їх можливість та особливості дії, без спеціально розроблених підходів до їх використання, без планування стратегії лікування з позиції доцільності.

Патогенетичні особливості мозкових катастроф дозволили виділити первинний та вторинний медикаментозний захист мозку, в основі яких окрім послаблення глутамат-кальцієвої ексайтотоксичності повинно лежати гальмування індукції віддалених наслідків гіпоксії-ішемії, що включають генетично-запрограмовані молекулярні механізми загибелі нервових клітин. Серед перспективних мішеней нейропротективної терапії звертає на себе увагу сімейство білків теплового шоку HSP70 та фактору, що індукується гіпоксією Hif-1 α , який забезпечує довготривалу адаптацію клітин до умов гіпоксії. Саме дослідження на цьому рівні структурно-функціональної організації живої системи зумовлює особливий науковий інтерес щодо задач, які здобувач вирішував у своїй дисертаційній роботі шляхом пошуку нейропротекторів серед препаратів, що потенційно можуть модулювати

рівень HSP70 в умовах ішемічного пошкодження головного мозку: тамоксифен, мелатонін, глутамін і фактор теплового шоку-1 (HSF-1).

Отже, вибрана дисертантом тема конкретного дисертаційного дослідження без усяких сумнівів є високоактуальною і важливою з огляду на фундаментальне та практичне значення результатів.

Ступінь обґрунтованості положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP70/HIF-1α-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

Дисертант є співвиконавцем вищезазначених тем.

Результати досліджень, представлених в дисертації, обґрунтовані об'ємним і достовірним матеріалом. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів фармакологічних, токсикологічних, електрофізіологічних, біохімічних, морфологічних, імуногістохімічних, фармакокінетичних, квантово-хімічних досліджень, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній і математичній обробці отриманого цифрового матеріалу, що відповідає міжнародним стандартам. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає сформульованим цілі та задачам дослідження, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Загальні відомості про роботу. Дисертаційна робота викладена на 200 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення результатів, а також висновків та списку використаних літературних джерел. Дисертація ілюстрована 20 таблицями та 26 рисунками. Список використаних джерел налічує 305 найменувань (170 – латиницею).

За темою дисертації опубліковано 16 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах, 3 з яких реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, Ulrich's Periodical Directory, 9 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України.

Характеристика змісту роботи. Вступ до роботи написано лаконічно із залученням основних посилань на узагальнюючі літературні джерела. Він є достатнім як з позиції актуальності обраної теми, так і сформульованої мети та завдань досліджень. У вступі охарактеризовано наукову новизну дослідження та її науково-практичну цінність. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних, базових результатів досліджень.

Огляд літератури висвітлює молекулярно-біохімічні механізми розвитку постішемічної деструкції та шляхи пошуку корекції порушень

HSP70-опосередкованих механізмів ендогенної нейропротекції при гострій ішемії головного мозку і складається з трьох підрозділів: «Основні клітинно-молекулярно-біохімічні механізми постішемичної нейродеструкції», «Сучасна стратегія нейропротекції при ішемічному інсульті» та «Участь білків теплового шоку HSP70 в механізмах ендогенної нейропротекції». Перспективність використання модуляторів HS». Проаналізовано всі етапи ішемического каскаду розвиваються в перші хвилини і години інсульту або будь-якого ішемичної-гіпоксического ураження речовини мозку і, взаємопотенціюя дії один одного, призводять до важких функціонально-морфологічних пошкоджень структур головного мозку.

Так, в умовах ішемічного ушкодження запускається неконтрольована гіперпродукція АФК, яка має ланцюговий характер і посилюється на тлі виснаження антиоксидантних систем. Основними джерелами АФК в головному мозку є мітохондріальний дихальний ланцюг (МДЛ), НАДФН-оксидази і ксантиноксидаза. При ішемічному порушенні в результаті активації анаеробного гліколізу відбувається накопичення лактату і збільшення протонів водню H^+ . Виснаження антиоксидантних ферментів призводить до утворення надлишку гідроксил-радикала O_2^- , який взаємодіючи з протонами водню утворює агресивний гідроксил-аніон OH^- . Також O_2^- атакує сигнальну молекулу NO з утворенням потужного окислювача пероксинітрит-радикалу $ONOO^-$. Гіперстимуляція NMDA-рецепторів призводить до активації Ca^{2+} залежної нейрональної синтази оксиду азоту nNOS, яка синтезує NO, що призводить до збільшення рівня $ONOO^-$, який пошкоджує мітохондрії за рахунок перекисного окислення і нітрозилування мембранних ліпідів. Встановлено, що NO-радикал підвищує внутрішньоклітинний рівень білку p53, що призводить до зниження активності Mn-супероксиддисмутази і рибонуклеотидредуктази, посилюючи шкідливу дію вільних радикалів.

Важливу роль у долі клітин відіграють гени раннього реагування (c-fos, c-jun, krox-20), які неминуче експресуються у відповідь на пошкодження. Білки генів раннього реагування – c-jun, c-fos утворюють димери з іншими білками D-Jim, ATF (активуючий фактор транскрипції), в результаті чого утворюється AP-1 комплекс. Під дією c-fos, c-jun і AP-1 активується індукцйбельна NO-синтаза, що призводить до гіперпродукції NO. Дані білки є медіаторами типу нейрональної загибелі і, в умовах гострої ішемії, перемикають апоптотичний шлях загибелі клітин на некротичний. На наступному етапі ішемічного каскаду спостерігаються відстроковані в часі наслідки ішемії – локальне запалення, аутоімунні реакції, порушення мікроциркуляції, пошкодження гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Таким чином, внаслідок ішемічного інсульту ініціюються зміни в фізіологічних процесах нейротрофічності, нейропластичності і нейропротекції, що призводить до порушення функціонування нервових клітин і їхньої загибелі. Враховуючи характер змін, що відбуваються внаслідок гострої церебральної ішемії, актуальним є пошук шляхів безпечної і адекватної корекції цього стану.

Доведено, що напрямки диференційної терапії II повинні бути спрямовані на корекцію і стабілізацію життєво важливих функцій, профілактику та лікування ускладнень, вторинну профілактику та лікування раннього повторного інсульту, ранню реабілітацію.

Сучасні уявлення про каскад ішемічного пошкодження дають змогу виділити два основні напрямки патогенетичної терапії: реперфузія тканин мозку і нейропротекція. По суті, кожен етап ішемічної нейродеструкції, описаний вище, може слугувати фармакологічною мішенню для терапії II. На сьогоднішній день нейропротекцію поділяють на первинну і вторинну. Препарати *первинної нейропротекції* орієнтовані на переривання механізмів швидкої некротичної гибелі нейронів внаслідок розвитку глутамат-кальцієвого каскаду. Рациональним вважається призначення цих препаратів протягом перших 3-х діб з початку II, особливо в перші 12 годин. Серед препаратів первинної нейропротекції виділяють антагонисти фенциклідинового і гліцинового сайтів NMDA-рецепторів Дизолципін, Церестат, Декстрофан і GV150526, які достовірно підвищували виживаємість експериментальних тварин, але сума побічних ефектів або недостатня ефективність в клінічній фазі дослідів призупинила їх випробування. Тим не менше продовжується дослідження модуляції NMDA рецепторів при II.

На відміну від ноотропів, нейропротектори мають більш широкий спектр дії, при цьому безпосереднього впливу на нейрони вони не спричиняють, а створюють умови, що усувають або зменшують патофізіологічні і біохімічні порушення в нервових клітинах і підвищують їх стійкість до гіпоксії. Однак основною проблемою застосування цих препаратів залишається складність відтворення отриманих результатів на клінічних моделях.

Таким чином, рішення даної проблеми полягає в пошуку нових фармакологічних мішеней для потенційних нейропротекторів і вдосконалення існуючих результатів шляхом обґрунтування і раціоналізації терапевтичних комбінацій лікарських засобів.

Одним з найбільш вивчених факторів цитопротекції вважають сімейство білків теплового шоку HSPs (Heat shock proteins), який є еволюційно невід'ємною частиною функціонування всіх клітин, про що свідчить їх висока ступінь гомологічності та наявність у всіх існуючих організмах. HSP₇₀ розглядається як білок-шаперон, що забезпечує потужний протеостаз клітин. Шаперонна функція HSP₇₀ полягає во взаємодії з пошкодженими, денатуризованими, вперше синтерированими білками з наступним визначенням їх долі. Поява і накопичення в клітині пошкоджених білків збільшує експресію HSP₇₀. Дія HSP₇₀ призводить до формування термотолерантності – феномену адаптації до дії підвищених температур та збільшення температурного порогу чутливості за рахунок стабілізації білкових молекул з допомогою HSP₇₀ при первісному, менш сильному нагріванні. Білки HSP₇₀ необхідні для відновлення і виживання клітин в стресових умовах, їх кількість корелює із тяжкістю перебігу різних патологічних станів, таких як: ішемія, запалення, аутоімунні процеси,

злоякісні пухлини, бактеріальні та вірусні інфекції, нейродегенеративні захворювання. Участь HSP₇₀ в механізмах холдингу, фолдингу и рефолдингу неправильно зібраних білків, а також дезагрегації і елімінації денатурованих білків, що накопичуються в умовах стресу, забезпечує захист мембран органел, перед усім мітохондрій, і самих клітин від пошкоджень.

Науковими роботами останніх років встановлена пряма цитопротекторна дія HSP₇₀, яка реалізується шляхом регулювання процесів апоптозу і некрозу клітин. HSP₇₀ гальмує мітохондріальний і цитоплазматичний шлях апоптозу. Різні види клітинного стресу можуть призвести не тільки до збільшення внутрішньоклітинного вмісту HSP₇₀. У ряді випадків стрес індукує процеси транслокації HSP₇₀ на плазматичну мембрану і / або вивільнення цих білків в позаклітинний простір, що призводить до формування позаклітинного пулу цих білків, що вільно циркулюють в організмі. В багатьох роботах, присвячених вивченню механізмів ендогенної нейропротекції в умовах ішемії спостерігається відновлення роботи глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи на тлі підвищення рівня HSP₇₀, а введення екзогенного HSP₇₀ призводить до збільшення функціональної активності глутатіонової системи в ішемізованих нейронах експериментальних тварин.

Аналіз літературних даних дозволив виділити кілька різноспрямованих фармакологічних препаратів і речовин, які потенційно можуть модулювати систему білку HSP₇₀. проведений аналіз літературних даних обумовлює перспективність і доцільність дослідження обраних препаратів і речовин з метою встановлення механізмів нейропротекторної дії, що обумовлена впливом на експресію білку теплового шоку HSP₇₀.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» представлений характеристиками об'єктів та предметів дослідження, характеристиками лабораторних тварин та переліку використаних засобів та методів дослідження. У дисертаційній роботі застосовували наступні препарати: Тамоксифен («Тамоксифен-здоров'я») – виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»; Мелатонін («Віта-Мелатонін», Melatonin) – виробник ПАТ «Київський вітамінний завод»; Глутамін (L-Glutamine, 2-амінопентанамід-5-ова кислота) виробник Sigma-Aldrich, США; HSF-1 (Heat Shock Factor-1) – виробник Sigma-Aldrich, США; Пірацетам (Piracetam) – виробник ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод»; Мексидол (етилметилгідроксипіридин сукцинат) – виробник ТОВ Медичний центр «Еллара», Росія.

Ефективність обраних препаратів та механізми їх дії вивчалися в експериментах на 250 статевозрілих щурах лінії Вістар масою 180-230г, 40 чотирьохтижневих щурятах, отриманих ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, атестованому МОЗ України (свідоцтво про реєстрацію № 033/18 від 26.12.2018, чинне до 25.12.2023р.).

Дисертант в своїх експериментах використала дуже широкий набір експериментальних підходів для вирішення поставленої мети, яку він

сформулював наступним чином: «експериментальне обґрунтування використання тамоксифену, мелатоніну, глутаміну та HSF-1 в терапії гострого порушення мозкового кровообігу шляхом встановлення їх впливу на молекулярні HSP 70 – опосередковані механізми формування ланок нейродеструкції та ендогенної нейропротекції в умовах церебральної ішемії». Для її виконання були поставлені та вирішені 6 основних завдань.

Відтворення гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) у тварин проводили шляхом двосторонньої незворотної оклюзії загальних сонних артерій під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Щодня протягом 4 діб (гострий період церебральної ішемії) оцінювали тяжкість неврологічних розладів у балах за шкалою stroke-index [C.P. McGraw], реєстрували загибель та розраховували відсоток летальності тварин в усіх експериментальних групах. ED₅₀ HSF-1 визначали експериментально на моделі гострої церебральної ішемії (200 мкл/кг). Відтворення нейродеструкції *in vitro* проводили шляхом внесення в нейрональну суспензію токсичних доз глутамату 100 мкмоль/л (моделювання глутаматної ексайтотоксичності), з подальшою інкубацією протягом 60 хвилин при 37°C.

Оцінку показників енергообміну тканин головного мозку визначали за вмістом аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) методом тонкошарової хроматографії. Направленість та інтенсивність гліколізу оцінювали спектрофотометрично за рівнем пірувату (метод Умбрайта) та лактату (метод Хохорста); активність окиснення в циклі трикарбонових кислот – за вмістом малату (метод Хохорста) і активністю НАД-залежної малатдегідрогенази. Функціональний стан мітохондрій оцінювали фотометрично на спектрофотометрі Libra S32PC по відкриванню мітохондріальної пори (МП) та мітохондріальному трансмембранному потенціалу (Ψ). Для з'ясування глибини патологічного процесу і ступеню розвитку оксидативного стресу в тканині головного мозку визначали вміст продуктів окислювальної модифікації білку за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ). Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) флуориметрично з орто-фталевим ангідридом на флуориметрі Quantech. Активність глутатіонредуктази (GR) і глутатіонтрансферази (GST) вимірювали спектрофотометрично на спектрофотометрі Libra S32PC. Визначення активності супероксиддисмутази проводили спектрофотометрично. Нітротирозин визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем «Nitrotyrosine ELISA Kit. Вміст HSP₇₀ білку в тканинах мозку визначали методом Вестерн-блот аналізу, а також за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія) з використанням тест-систем AMP'D® HSP70 high sensitivity ELISA kit, Enzo (Швеція). Для оцінки рівня експресії мРНК Hsp70, Hif-1 α , Hif-3 α використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу ампліфікатор

CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Визначення загального білку проводили за методом Лоурі.

Для дослідження морфофункціонального стану нейронів на ротаційному мікромомі виготовляли зрізи IV-V шарів сенсомоторної зони фронтальної кори товщиною 5 мкм. Зрізи депарафінували і фарбували галоціанінхромовими галунами по Ейнарсону для специфічного виявлення РНК. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Германия). Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0». Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилась перевірка гіпотези про нормальність розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk). За умов нормального розподілу, встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, або критерій – Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона або Спірмена. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $p < 0,05$ (95%).

Основний матеріал дисертації викладений в розділі «Результати власних досліджень», де автор послідовно представляє результати власних досліджень, їх оцінку, обговорення та проміжні висновки.

Розділ 3 присвячений результатам власних досліджень ролі білків теплового шоку HSP₇₀ в механізмах ендогенної нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу. В умовах оксидативного стресу білки теплового шоку забезпечують адаптацію клітин до ішемії і підтримують функціональну активність ферментативних систем, однак багаточисельні дослідження показують неоднорідну експресію і активність HSP₇₀ в різних структурах головного мозку, що звертає на себе особливу увагу. В роботі встановлено тісний зворотній кореляційний зв'язок між тяжкістю неврологічного дефіциту і концентрацією HSP₇₀ як в корі головного мозку (коефіцієнт Пірсона $r = -0,91$), так і в гіпокампі (коефіцієнт Пірсона $r = -0,81$) тварин з ГПМК. Встановлено, що гіпокамп більш чутливий до ішемічного пошкодження, оскільки в нейронах цієї області спостерігалось виражене зниження концентрації HSP₇₀ порівняно з зоною кори, де рівень білку шаперону 70 помірно підвищувався в залежності від ступеня неврологічного дефіциту. Білки теплового шоку HSP₇₀ є невід'ємними учасниками механізмів ендогенної нейропротекції, оскільки на тлі їх дефіциту спостерігається інтенсифікація процесів нейродеструкції і розвиток незворотних неврологічних порушень.

В ході роботи на моделі гострої церебральної ішемії встановлена середньоефективна доза фактору теплового шоку HSF-1, що становить 200 мкл/кг. В дослідженнях *in vivo* встановлено, що в результаті ГПМК відбувається пригнічення роботи ланок ендогенної нейропротекції – знижується рівень HSP₇₀ в цитозольній фракції в 9,7 рази і в мітохондріальній фракції в 3,2 рази відносно УО групи. Курсове призначення тваринам з ГПМК досліджуваних препаратів призводить до збільшення рівня білку HSP₇₀ в головному мозку - в цитозольній фракції (HSF-1 в 11,3, тамоксифен в 5,1, мелатонін в 2,6, глутамін в 1,5 рази) і в мітохондріальній фракції (HSF-1 в 2,6 ($p < 0,05$), тамоксифен в 1,5, мелатонін в 1,2, глутамін в 1,1 рази) відносно контролю та встановлено, що ГПМК викликає пригнічення експресії в цитозольній фракції головного мозку мРНК Hsp70 в 3,2 рази, мРНК Hif-1 α в 1,5 рази і мРНК Hif-3 α в 1,3 рази відносно УО.

Методом Вестерн-блот аналізу був визначений рівень HSP₇₀ в корі і гіпокампі мозку експериментальних тварин. Відзначалося значне підвищення концентрації білків теплового шоку 70 в корі і гіпокампі групи з легкими неврологічними порушеннями: на 137,2% і 27,6% відносно УО. Встановлена залежність досліджуваних показників при наростанні неврологічного дефіциту пов'язана з розвитком оксидативного і нітрозативного стресів і зривом компенсаторних можливостей організму. Крім того, під дією надлишку АФК окисної модифікації піддаються самі HSP₇₀ білки, знижується експресійна активність генів, що кодують синтез шаперонів. Це порушує функціональну активність HSP-білків, обмежує їх протекторні властивості в умовах ішемії. Також, шляхом статистичного аналізу був встановлений кореляційний зв'язок між концентрацією HSP₇₀ і GSH, як в корі головного мозку (коефіцієнт Пірсона $r = 0,71$), так і в гіпокампі (коефіцієнт Пірсона $r = 0,80$). Досліджувані препарати позитивно впливали на показники ТДС в головному мозку тварин з ГПМК. Введення експериментальним тваринам HSF-1, тамоксифену, мелатоніну, глутаміну підвищувало рівень GSH в 4,1, 3,6, 3,3, 3,1 рази відповідно, а також зменшувало концентрацію GSSG в 2,3, 1,8, 1,6, 1,5 рази відповідно.

Отримані результати дозволили зробити висновок, що білки теплового шоку HSP₇₀ є невід'ємними учасниками механізмів ендогенної нейропротекції, оскільки на тлі їх дефіциту спостерігається інтенсифікація процесів нейродеструкції і розвиток незворотних неврологічних порушень.

4-й розділ присвячений дослідженню нейропротективних властивостей тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 та глутаміну при моделюванні нейродеструкції в дослідах *in vitro* на моделі глутаматної ексайтотоксичності, відтвореної шляхом внесення токсичних доз глутамату (100 мкМ) в нейрональну суспензію.

Встановлено, що за даних умов спостерігається накопичення маркерів оксидативного стресу (АФГ і КФГ в 3,4 і 3,5 рази, нітротирозину на 156,7% більше відносно інтактної суспензії нейронів), з одночасним зменшенням концентрації ендогенного нейропротектора HSP₇₀ на 57,2% і пригніченням ТДС (GSH, GR і GST зменшувались на 54%, 35,7% і 36,7%). Був встановлений

прямий тісний кореляційний зв'язок між концентрацією білку-шаперону 70 і GSH (коефіцієнт Спірмена $r=0,92$).

Попереднє внесення досліджуваних препаратів в нейрональне середовище призводило до достовірного підвищення рівня HSP₇₀ (HSF-1 на 97,6%, тамоксифен на 70,2%, мелатонін на 60%, глутамін на 46%), підвищення рівня GSH (HSF-1 на 82,2%, тамоксифен на 53,5%, мелатонін на 40,8%, глутамін на 16,6%) і активації роботи GR і GST (HSF-1 на 45,4 і 43,5%, тамоксифен на 20,7 і 19,5%, мелатонін на 16,7 і 26,4%, глутамін на 10,5 і 14,3%), як наслідок розвиток оксидативного стресу значно гальмувався, про що свідчить зниження рівню нітротирозину (HSF-1 на 25,1%, тамоксифен на 23,6%, мелатонін на 38,3%, глутамін на 13,9%). Таким чином, встановлено, що досліджувані препарати при моделюванні глутаматної ексайтотоксичності в суспензії нейронів *in vitro* виявляють цитопротекторну дію за рахунок підвищення концентрації HSP₇₀.

Всі препарати в дослідженні *in vitro* підвищували концентрацію білку-шаперону HSP₇₀ і відновлювали роботу ТДС. Так, HSF-1 викликав найбільш виражене підвищення рівня HSP₇₀ на 97,6% відносно контрольної суспензії нейронів, що сприяло підвищенню рівня GSH на 82,2% і зниженню GSSG в 2,2 рази. При цьому активність GR і GST підвищувалась на 45,4% і 43,5% відповідно відносно контрольної групи. Мелатонін підвищував концентрацію HSP₇₀ на 60% ($p < 0,05$), рівень GSH на 40,8% і знижував GSSG в 1,3 відносно групи контролю. Одночасно спостерігалось підвищення активності GR і GST на 16,7% і 26,4% відносно контролю. Введення тамоксифену викликало збільшення рівня HSP₇₀ на 70,2% і GSH на 53,5%, підвищення активності GR і GST на 20,7% і 19,5% на фоні зниження GSSG в 1,5 рази. Глутамін підвищував концентрацію білку-шаперону 70 на 46%, рівень GSH збільшувався на 16,6%, активність ферментів GR і GST підвищувалась на 10,5% і 14,3%, рівень GSSG знижувався в 1,1 рази відносно контрольної нейрональної суспензії. В групі препарату референсу не спостерігалось достовірних змін по відношенню до білку HSP₇₀ або роботи ТДС.

Автор робить висновок, що за даних умов реалізація нейропротективної дії тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну *in vitro* пов'язана з їх позитивним впливом на вміст білку ендогенної нейропротекції HSP₇₀, що відновлює пул глутатіону відновленого і роботу глутатіонспецифічних ферментів ТДС. Найбільший нейропротективний ефект в дослідженні *in vitro* встановлений у фактору теплового шоку-1, в меншій мірі – у мелатоніну і тамоксифену, мінімальний – у глутаміну. Результати дослідження *in vitro* визначають значення HSP₇₀, як важливої мішені фармакологічної корекції станів, що супроводжуються глутаматною ексайтотоксичністю.

Розділ 5 відведений визначенню середньоефективної дози HSF-1, який проводили на 70 безпорідних щурах на моделі гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) шляхом двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій.

В дослідженнях встановлено, що в результаті ГПМК відбувається пригнічення роботи ланок ендогенної нейропротекції – знижується рівень HSP₇₀ в цитозольній фракції в 9,7 рази і в мітохондріальній фракції в 3,2 рази відносно УО групи. Курсове призначення тваринам з ГПМК досліджуваних препаратів призводить до збільшення рівня білку HSP₇₀ в головному мозку – як в цитозольній фракції (HSF-1 в 11,3, тамоксифен в 5,1, мелатонін в 2,6, глутамін в 1,5 рази), так і в мітохондріальній фракції (HSF-1 в 2,6, тамоксифен в 1,5, мелатонін в 1,2, глутамін в 1,1 рази) відносно контролю. В результаті дослідження встановлено, що ГПМК викликає пригнічення експресії в цитозольній фракції головного мозку мРНК Hsp70 в 3,2 рази, мРНК Hif-1 α в 1,5 рази і мРНК Hif-3 α в 1,3 рази відносно УО.

Курсове введення досліджуваних препаратів призводило до активації експресії генів в цитозолі головного мозку експериментальних тварин – мРНК Hsp70 (HSF-1 в 4,1, тамоксифен в 2,5, мелатонін в 2,1, глутамін в 1,7 рази), мРНК Hif-1 α (HSF-1 8,2, тамоксифен в 11,6, глутамін в 7,0 рази) і мРНК Hif-3 α (мелатонін в 3,6 рази) відносно контрольної групи

Вплив досліджуваних засобів на HSP₇₀-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції призводить до підвищення активності АО-ферментів і пригнічення реакцій оксидативного стресу. Найбільш активно гальмував накопичення АФГ/КФГ мелатонін, зниження ніротирозину під впливом HSF-1 було найбільше. Введення досліджуваних препаратів призводило до підвищення активності СОД в цитозолі гомогенату головного мозку від 41,8% до 84,7%. Найбільш активним по відношенню до СОД виявився мелатонін.

Досліджувані препарати позитивно впливали на показники ТДС в головному мозку тварин з ГПМК. Введення експериментальним тваринам HSF-1, тамоксифену, мелатоніну, глутаміну підвищувало рівень GSH в 4,1, 3,6, 3,3, 3,1 рази відповідно, а також зменшувало концентрацію GSSG в 2,3, 1,8, 1,6, 1,5 рази відповідно. За ступенем збільшення активність GR і GST препарати розташувались наступним чином – HSF-1 в 3,4 і 1,6 рази, тамоксифен в 2,7 і 1,4 рази, мелатонін в 2,5 і 1,5 рази, глутамін в 2,3 і 1,3 рази відносно контрольної групи.

Досліджувані засоби здатні підвищувати активність СОД, можливо, як за рахунок HIF-1 α - підвищення її експресії, так і за рахунок запобігання окисної модифікації її структури. Курсове введення модуляторів білку HSP₇₀ тамоксифену, HSF-1, мелатоніну, глутаміну знижувало прояви мітохондріальної дисфункції, що підтверджувалось в підвищенні трансмембранного заряду мітохондрій в діапазоні від 1,9 до 3,5 разів і зменшені швидкості відкриття мітохондріальної пори в діапазоні від 1,5 до 2,5 разів відносно контролю. Введення досліджуваних препаратів сприяло відновленню енергопродукуючої функції мітохондрій і врівноваженню енергетичного співвідношення ЕЗ, ЕП, ІФ і ТКД. За ступенем підвищення рівнів АТФ-АДФ препарати розмістились наступним чином: HSF-1 – на 101,8-58,1%, мелатонін на 66,4-36,5%, глутамін на 52,2-29%, тамоксифен на 50,4-26,5%.

На фоні введення досліджуваних препаратів спостерігається відновлення морфо-функціональних показників нейронів. Так, HSF-1, мелатонін, тамоксифен і глутамін збільшували щільність нейронів (на 63,9, 56,9, 24,6 і 22,5%) і площу нейронів (на 32,8, 31,2, 6,7 і 5,6%) відповідно по відношенню до контролю. Вміст РНК в нейронах достовірно збільшували HSF-1 на 91,7%, мелатонін на 40,7%, тамоксифен на 34,3%, глутамін на 14,4% відносно контролю. Призначення тваринам з ГПМК досліджуваних препаратів достовірно знижувало летальність (HSF-1 на 50,8%, мелатонін 46,4%, тамоксифен 41,2% і глутамін 32,5%) і прояви неврологічного дефіциту (HSF-1 на 41,4%, мелатонін 37,9%, тамоксифен 29,8% і глутамін 16,2%) на 4-ту добу експерименту.

Таким чином, встановлено, що HSF-1, мелатонін, тамоксифен і глутамін виявляють значну нейропротективну дію при ГПМК, яка полягає в підвищенні експресії фактору ендогенної цито- і нейропротекції HSP₇₀, активації ферментативної (СОД, GR, GST) і неферментативної (GSH) ланки антиоксидантної системи, зниженні рівня маркерів оксидативного і нітрозативного стресу (АФГ, КФГ, нітротирозин), активації малат-аспартатного човникового механізму, підвищенні енергетичного потенціалу нейрону, підвищенні РНК і зниженні кількості деструктивних і апоптичних нейронів.

Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням для застосування мелатоніну, тамоксифену і глутаміну в комплексній терапії мозкових інсультів в якості засобів первинної та вторинної нейропротекції.

Наукова новизна отриманих результатів. Поза сумнівом, ступінь новизни роботи високий, оскільки мова йде про підвищення ефективності лікування мозкових інсультів шляхом застосування в якості нейропротекторів препаратів - модуляторів експресії білку теплового шоку HSP70 - тамоксифену, мелатоніну, глутаміну і HSF-1..

В наведеній роботі автором вперше встановлено, що нейропротективна дія тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну спрямована на підвищення в ішемізованому головному мозку концентрації ендогенного нейропротектора – білку теплового шоку 70 кДа (HSP70), який призводить до підсилення компенсаторно-приспосувальних механізмів стійкості нейронів до ішемії.

Вперше встановлено, що введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну в дослідях *in vitro* і *in vivo* підвищує концентрацію HSP70, експресію мРНК HSP70, HIF-1 α і HIF-3 α , нормалізують енергетичний метаболізм ішемізованого головного мозку за рахунок позитивної модуляції HSP70/HIF-1 α -залежних механізмів активації і регуляції малат-аспартатного човникового механізму та обмежують деструктивний вплив оксидативного стресу в ішемізованому головному мозку за рахунок HSP70/GSH – залежних механізмів активації антиоксидантної системи.

Вперше встановлено, що курсове введення тамоксифену, мелатоніну, HSF-1 і глутаміну підвищує щільність нейронів сенсомоторної зони кори, гальмує нейроапоптоз, підвищує вміст РНК в нейронах сенсомоторної зони

кори і, як наслідок, зменшує прояви неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Наукова новизна підтверджена 1 патентом України.

Практичне значення отриманих результатів. Практична значущість роботи полягає у тому, що вперше експериментально обґрунтована фармакологічна модуляція експресії HSP70 як перспективний напрямок нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу, а саме є експериментальним обґрунтуванням для застосування тамоксифену, мелатоніну і глутаміну в комплексній терапії гострого порушення мозкового кровообігу в якості засобів первинної (спрямованої на зменшення глутаматної ексайтотоксичності) і вторинної (спрямованої на зниження нейроапоптозу, нормалізацію енергетичного метаболізму) нейропротекції. Експериментально встановлені механізми дії модуляторів HSP70 можуть сприяти створенню нового покоління ефективних нейропротекторів в умовах гострого порушення мозкового кровообігу. Результати досліджень впроваджені в педагогічний процес та науково-дослідну роботу на 5 кафедрах фармакології вищих медичних навчальних закладів України.

Результати досліджень впроваджені в навчальний процес та науково-дослідну роботу на 9 кафедрах фармакології вищих медичних учбових закладів України.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014» (Запоріжжя, 2014); Восьмій національній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю пам'яті професора В.В. Дунасва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); V-му Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку науки і освіти» (Львів, 2020). Загалом матеріали дисертації викладені та обговорені на 16 з'їздах та конференціях, за результатами яких надруковані тези.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені лаконічно, що

свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.

В якісному і кількісному (6) характері і обсязі вони повністю відповідають матеріалу, опублікованому у фахових виданнях, викладеному в дисертації та авторефераті. Зроблені висновки характеризують основні досягнення, здобуті і викладені в дисертації.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Дисертаційна робота виконана на високому сучасному рівні, дає привід для наукової дискусії. Назва дисертації повністю відповідає змісту. Висновки аргументовані і базуються на великій кількості експериментальних даних. В дисертаційній роботі та авторефераті суттєвих недоліків не виявлено. І дисертація і автореферат написані красиво, логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення.

Зауваження:

1. Використання рівня значущості ($p < 0,01$) при статистичних розрахунках в роботі наведено, але не у всіх відповідних випадках.
2. Наявність розривів тексту та таблиць (ст. 104).
3. Відсутність використання при аналізі даних кореляційного аналізу між дослідженими показниками експериментальних груп між собою.
4. В роботі зустрічаються друкарські, стилістичні та орфографічні (ст. 48,53,82,93,107,115,143,173,228,241) помилки, не всі джерела літератури оформлені за правилами.

Ці зауваження і побажання не є принциповими, не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи та загальну позитивну оцінку дисертації, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

Крім того, хотілося б почути точку зору дисертанта на питання, що виникли у процесі роботи з дисертацією:

1. Пояснить роль специфічних модуляторів експресії білку теплового шоку HSP70 в формуванні та прогресуванні ендотеліальної дисфункції, яка розглядається як ключова ланка патогенезу серцево-судинної патології взагалі та ішемічних уражень мозкового кровообігу зокрема. Які ланки-мішені на вашу думку є найбільш перспективними в цьому відношенні для ендотеліозалежної нейропротекції з урахуванням отриманих Вами результатів дослідження?
2. Білки теплового шоку здатні модулювати процес програмованої загибелі клітини на різних етапах. З одного боку, білки теплового шоку беруть участь в придушення апоптозу, наприклад, Hsp27, з'єднуючись з білком Bax, а Hsp70 і Hsp90 – з Ask-1, пригнічують Fas-опосередкований апоптоз. З іншого боку, відома і проапоптотическая роль білків теплового шоку. Так, Hsp27 може брати участь в індукції TNF-залежного апоптозу, пригнічуючи IkB деградацію. На Вашу думку, яку роль білки теплового шоку відіграють в молекулярних механізмах регуляції апоптозу пухлинних клітин та яким чином це співвідноситься з ефективністю протипухлинної терапії.

3. На основі Ваших досліджень які рекомендації Ви змогли б внести у вигляді доповнень в інструкції для медичного застосування до препаратів, що досліджувались тамоксифен, мелатонін, глутамін)?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертація Білої Юлії Володимирівни «Фармакологічна модуляція HSP 70 – опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії» являє собою закінчену наукову роботу, що виконана на хорошому методичному рівні із застосуванням сучасних методів на достатній кількості тварин.

Робота має наукову новизну, тому що присвячена дослідженню патобіохімічних механізмів розвитку патогенезу нейродеструкції головного мозку з участю сімейства білків теплового шоку HSP70 та фактору, що індукується гіпоксією Hif-1 α , та впливу на них препаратів, що потенційно можуть модулювати рівень HSP70 в умовах ішемічного пошкодження головного мозку: тамоксифен, мелатонін, глутамін і фактор теплового шоку-1 (HSF-1).

Робота володіє практичним значенням, тому що обґрунтовує доцільність фармакологічної модуляції експресії HSP70 як перспективного напрямку нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу.

Таким чином, за актуальністю проблеми, високим методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, їх вірогідністю, обґрунтованістю висновків, ступенем опублікування та загальним науковим рівнем дисертаційна робота Білої Юлії Володимирівни «Фармакологічна модуляція HSP 70 – опосередкованих механізмів нейропротекції в умовах церебральної ішемії», що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, є самостійним, завершеним науковим експериментальним дослідженням і повністю відповідає вимогам п. 10 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 (зі змінами), а її автор робота Біла Юлія Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Професор кафедри
медичного та фармацевтичного права,
загальної і клінічної фармації
Харківської медичної академії
післядипломної освіти МОЗ України
доктор медичних наук, професор



Е.В. Супрун