

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Комнацької Катерини Миколаївни: «Нейропротективні ефекти мелатоніну при контузійній травмі ока (експериментальне дослідження)», подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія

Актуальність теми дисертації

Контузія органу зору є однією з особливо складних клінічних і соціальних проблем і по тяжкості посідає друге місце після проникаючих поранень в структурі пошкодження органу зору і реєструється в 20-42,2% випадків. Основною складовою дорослого населення з даною патологією (до 70%) є особи працездатного віку, у віці 19-45 років (63%), переважно чоловічої статі (78%). У зв'язку з криміногенною ситуацією, що виникла, а також проведенням антитерористичної операції на Південному Сході країни різко збільшилася кількість пошкоджень органу зору, серед яких контузія вийшла на перше місце і спостерігається в 50-64% випадків. За даними літератури, контузійні внутрішньоочні крововиливи зустрічаються від 60,4% до 70% випадків, що супроводжуються порушенням гемодинаміки ока, внутрішньоочного тиску. Найбільш важкий перебіг мають крововиливи в склоподібне тіло (гемофтальм) з розвитком швартоутворення, тракційних змін, субатрофії ока, симпатичної офтальмії. Все це призводить до зниження зору і сліпоти. Вивчено механізм контузійного пошкодження оболонок ока (гіпертензивний, гіпотензивний, фібриноїдний синдроми, синдром no-reflow, оксидативний стрес, ішемічна нейродеструкція). Протягом багатьох років ведуться дослідження щодо консервативного лікування геморагій в різні відділи очі, ведеться пошук найбільш ефективних і безпечних препаратів, вивчаються способи та дози їх застосування, удосконалюються схеми розсмоктуючої терапії. На початку 90-х рр. минулого століття увагу фармакологів і клініцистів як мішень медикаментозного впливу при контузійних пошкодженнях оболонок ока привернули вільно-радикальні

ланки оксидативного стресу. Гіперпродукція активних форм кисню і NO нейрохімічна реакція (трансмітерний аутокоідоз) і IL-1b-обумовлена гіперекспресія iNOS призводить до окисної модифікації білкових структур рецепторів, іонних каналів, мембран клітин зорового аналізатора, що викликає порушення фотохімічних реакцій, пригнічення генерації і проведення нервового імпульсу, зниження зору і сліпоті. Як правило, подібні порушення відбуваються на тлі депривації експресії антиоксидантних систем, контролюючих фотохімічні реакції в сітківці. Так, у пацієнтів з контузійними ураженнями оболонок ока виявлено зниження експресії мРНК Se-ГПР і її активності. В цей період часу як водорозчинні антиоксиданти в офтальмологічній практиці широке застосування знайшли емоксипін, мексидол, тіотриазолін, цистеїн, солі янтарної кислоти і т.д. Однак, ефективність застосування антиоксидантів не завжди задовольняє вимогам офтальмологів, тому що їх механізм дії не зачіпає ініціальні і первинні етапи молекулярно-біохімічного каскаду пошкодження оболонок ока при контузії. Останнім часом, в світлі революційних відкриттів в нейробиології, нейрохімії і нейрофізіології і розкриття ролі глутаматної ексайтотоксичності, пускових механізмів нейроапоптозу, молекулярних факторів ендогенної нейропротекції, розглядається питання про включення в комплексну терапію контузійної травми ока і нейропротекторів. Основний напрямок нейропротекції при травмі очей - зниження ексайтотоксичності (іони магнію і гліцин), енергодефіцит (солі янтарної кислоти, тіотриазолін), АФК / NO-залежні механізми нейродеструкції (тіотриазолін, мексидол, ерготеїн, емоксипін, глутатіон, цистеїн). Інтерес представляють препарати, що гальмують нейроапоптоз (рекомбінантні препарати антиапоптичного білка bcl-2). Крім того, розглядається перспективність застосування препаратів - модуляторів ендогенної нейропротекції, зокрема, регуляторів експресії білка теплового шоку 70 кДа -HSP70 (селективні модулятори естрогенових рецепторів, інтермедіати системи глутатіону - селеназа, глуторедоксін, глутатіон, мелатонін). Особливу увагу в цьому відношенні привертає

мелатонін. У мелатоніну виявлені властивості, що характеризують його як потенційний нейропротектор - пригнічувати гідроксил-радикал, гальмувати активність iNOS, підвищувати експресію HSP70. Крім того, у мелатоніну виявлена здатність регулювати експресію VEGF. Таким чином, актуальність даної роботи на сучасному етапі безсумнівна и обумовлена, в першу чергу, відсутністю в арсеналі сучасного лікаря - офтальмолога високоефективного і малотоксичного препарату нейропротективної дії.

Дисертаційна робота виконана за планом спільної науково-дослідної роботи Науково-дослідного центру, Навчально-науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки лікарських засобів та біологічно-активних речовин «Фармадар» та кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України : «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів» (№ державної реєстрації 00115U007126) і виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дисертант є співвиконавцем даної теми.

Ступінь обґрунтованості положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність

Оцінку нейропротективних властивостей мелатоніну було проведено в декілька етапів. На першому етапі було створено та експериментально обґрунтовано вибір моделі контузійної травми ока для оцінки ефективності нейропротекції. На другому етапі було експериментально обґрунтована умовно-терапевтична доза мелатоніну при моделюванні контузійного ураження органу зору. На третьому етапі було вивчено вплив мелатоніну на показники апоптозу та проліферації в різних структурах зорового аналізатора (ендотелій рогівки, епітелій кришталика, сітківка) за умов експериментальної контузії ока. На четвертому етапі було вивчено дію мелатоніну на показники оксидативного й нітрозативного стресу та енергетичного обміну в зоровому аналізаторі та при експериментальному контузійному ураженні органу зору. На п'ятому етапі було встановлено вплив мелатоніну на мікроциркуляцію в судинах циліарного тіла та внутрішньоочний тиск кролів без

офтальмопатології та при контузійному ураженні органу зору. Шостим етапом було проведено порівняльну оцінку ефективності застосування мелатоніну та референс-препаратів (цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну) з метою ліквідації структурно-функціональних порушень при експериментальній контузії органу зору.

В результаті проведених досліджень отримані переконливі дані про високий терапевтичний потенціал нового підходу до нейропротекції при травматичному ураженні органів зору та обґрунтована доцільність застосування мелатоніну як засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень у зоровому аналізаторі.

Наведені методики є загальноприйнятими в рамках поставлених завдань, в достатній мірі відображають високий рівень досліджень. Проаналізовано і зреферовано велику кількість наукової літератури та медичних джерел - 248 найменування, з них 94 - кирилицею, 154 - латиницею. Дисертаційна робота викладена на 186 сторінках друкованого тексту та ілюстрована 14 таблицями та 31 рисунком.

У роботі використано достатню кількість для достовірного аналізу лабораторних тварин (80 кролів самців породи Шиншила, масою 3,5-4,0 кг). Переконливі результати з адекватним використанням методів статистичної обробки (дисперсійний, регресійний аналізи, бінарна логістична регресія) зумовили високу статистичну значущість, на основі яких дисертант обґрунтував положення, висновки та практичні рекомендації.

Все це однозначно свідчить, що висунуті автором наукові положення і висновки досить обґрунтовані, достовірні, впливають з проаналізованого фактичного матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертаційна робота Комнацької К.М. являє собою дослідження, в якому вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено використання як нейропротектору мелатоніну при контузійній травмі ока та встановлено їх перевагу перед тіотриазоліном, цитиколіном, корвітином.

Вперше встановлено що механізми нейропротекторної дії мелатоніну при контузії органу зору реалізуються за рахунок зменшення в крові активності нейрон-специфічної енолази та рівня білку S 100, зменшення маркеру апоптозу в сітківці, ендотелію рогівки та епітелію кришталика, зменшення маркеру нейрогліальної проліферації, зниження в сітківці рівня карбонільних груп протеїнів, малонового діальдегіду, нітритів та нітратів, глутамату та підвищення рівня АТФ і глутатіонпероксидази, підвищення зниженого показника внутрішньоочного тиску та відновлення циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні. Вперше, з використанням комплексного підходу, здійснено доклінічну оцінку ефективності мелатоніну як засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень в органі зору за умов його контузії на власно створеній моделі травматичного ураження зорового аналізатора у кролів. Вперше на моделі контузії ока показано, що семиденне курсове введення мелатоніну дозою 10 мг/кг двічі на добу внутрішньовенно, сприяло реалізації антинейрогліопроліферативної дії та антиапоптотичної дії препарату в клітинах сітківки, рогівки та кришталика.

Вперше досліджені та узагальнені функціональні (позаклітинні) ефекти мелатоніну на орган зору при його контузійній травмі. Так, вперше показано, що семиденне курсове введення мелатоніну в дозах 5, 10 та 15 мг/кг не впливає на середні значення внутрішньоочного тиску у кролів без офтальмопатології, а за умов постконтузійної гіпотонії - підвищує знижений внутрішньоочний тиск, і за цією стабілізуючою дією мелатонін у дозі 10 мг/кг перевершив мелатонін дозами 5 та 15 мг/кг. Вперше досліджено кровоплин в судинах циліарного тіла ока в динаміці його контузійної травми та встановлено, що семиденне курсове введення мелатоніну сприяло відновленню циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні.

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

Практична значущість роботи визначається тим, що вперше розроблено спосіб підвищення ефективності лікування контузійної травми органу зору

шляхом застосування за новим призначенням метаболітотропних цито-(органо)протекторів (мелатоніну, цитиколіну, корвітину, тіотриазоліну).

Результати експериментально обґрунтовують доцільність застосування мелатоніну в терапії контузії зорового аналізатора, створення його нової лікарської форми, з метою впровадження препарату в практичну систему охорони здоров'я за новим призначенням, а саме як нейропротектора при контузійній травмі органу зору, та внесення змін по розширенню показів до його застосування в офтальмологічній практиці.

На даний час, на основі отриманих експериментальних даних нейропротекторної активності мелатоніну в умовах контузійної травми органу зору, ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» здійснює промислове впровадження мелатоніну для парентерального застосування за новим призначенням в якості нейроретинопротекторного засобу при ішемічному та травматичному ураженні зорового аналізатора (наказ по ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» від 14.12.2017 р. № 1217/14-01). Розроблена модель контузії ока може бути використана в доклінічній оцінці потенційних лікарських засобів та біологічно-активних сполук з нейроретинопротекторною активністю (патент України на корисну модель № 109424 від 25.08.2016 р. та № 109789 від 12.09.2016 р.). Результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, із них 6 статей у фахових виданнях в галузі медицини, рекомендованих ДАК МОН України, 3

статті в іноземних журналах з напрямку дисертації, 6 тез доповідей на наукових конференціях та з'їздах, 2 патенти України на корисну модель.

Всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації знайшли своє відображення у друкованих роботах. Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації, представлені в дисертації, відображені в опублікованих працях.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків

Дані досліджень, отримані у рамках виконання дисертаційної роботи, можуть бути використані в науковій, навчальній та лікувальній роботах науково-дослідних установ і медичних ВНЗів та інших медичних закладах.

Обсяг і структура дисертації

1. Оцінюючи зміст дисертації, слід зазначити, що робота легко читається і сприймається, виклад основних результатів дослідження компактний та конкретний. Робота побудована в традиційному стилі та складається з вступу, огляду літератури, характеристики матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення результатів дослідження - заключення, висновків, списку використаної літератури, яка включає 248 найменування, з них 94 - кирилицею, 154 - латиницею. Дисертація ілюстрована 14 таблицями та 31 рисунком. Огляд літератури докладний і структурований, автором чітко охарактеризовані невивчені на сьогоднішній день або сумнівні аспекти, що стосуються патогенезу травматичної контузії органу зору. В обзорі Автор наводить дані, що травми ока залишаються однією з основних медико-соціальних проблем більшості країн світу, і наша держава в цьому аспекті не є винятком. В нозологічній структурі первинної інвалідності серед осіб працездатного віку на травматичне ураження ока припадає 29%, що виводить дану категорію на друге місце з поміж інших очних хвороб. Також в літературному обзорі Автор демонструє механізми формування нейродеструкції при контузійній травмі ока. Показано, що в патогенезі контузійного ураження ока лежать такі

механізми, як гіпертензивний, гіпотензивний, фібриноїдний синдроми, синдром no-reflow, оксидативний стрес, ішемічна нейродеструкція. В даний час оксидативний стрес розглядається як основний універсальний механізм розвитку ускладнень зорового аналізатору при контузійній травмі. Оксидативний стрес, що індукується гемовим залізом (II), гіперпродукцією активних форм кисню (супероксидрадикал, гідроксилрадикал) мітохондріальними шунтами і при метаболізмі катехоламінів запускає реакції пошкодження білкових структур іонних каналів і рецепторів, а також активування і фосфорилування цитозольної фосфоліпази $A_2(cPLA_2)$ із збільшенням утворення арахідонату і простагландину E_2 , які призводять до зміни проникності судинної стінки і тромбоутворенню. В результаті оксидативного стресу в процесі пероксидації жирних кислот утворюються цитотоксичні продукти (МДА, 4-гідрокси-транс-2-ноненаль), які пригнічують клітинний сигналітет, пошкоджують ДНК, знижують експресію генів, приймають участь в ініціації апоптозу. Також в обзорі показана роль трансмітерного аутокоїдосу у формуванні механізмів нейродеструкції - активації кальцієвих каналів, підвищення експресії iNOS, підвищення активності фосфоліпази A, гіперпродукції активних форм кисню, вторинне пошкодження мітохондрій. Розглянуто і механізми формування синдрому no-reflow в просттравматичному періоді, в результаті чого підсилюються ішемічні процеси, в результаті яких активуються «паразитарні» реакції в мітохондріях і мітохондрії становляться джерелами активних форм кисню і NO, а також проапоптичних білків. Описано механізми ініціації нейроапоптозу при ішемії. В обзоре наведено дані, що на даний час розробляються підходи до патогенетичного лікування контузійної травми ока. Автор робить вивод, що енергодефіцит, оксидативний та нітрозативний стрес, дезорганізація в системі обміну NO - ось провідні вектори напрямку маніфестації загибелі клітини та основні фармакодинамічні мішені можливого впливу при проведенні цитопротекторної терапії. Корекція метаболічного статусу і енергозалежних процесів після контузії може

запобігти каскаду патологічних змін і обмежити виразність порушення структурно-функціонального стану органу зору в постконтузійному періоді. В огляді літератури Автор аналізує сучасний стан нейропротективної терапії, дає визначення первинної і вторинної нейропротекції через призму комплексної терапії контузійного ураження ока. С цих позицій автор оцінює характеристики широко застосованих в офтальмологічній практиці і неврології препаратів – тіотриазоліну, корвітину і цитиколіну як антиоксидантів, антигіпоксантив, регуляторів енергетичного обміну і протиішемічних засобів, що мають нейпротективний потенціал. Далі автор достатньо детально описує фармакологічні властивості препарату - кандидата – мелатоніну і теоретично обґрунтовує перспективність його застосування при контузії ока як засобу нейропротекції. У розділі «матеріали і методи дослідження» автором приведений дизайн дослідження, вказані вид лабораторних тварин (кролі породи Шиншила), джерело їх отримання, умови утримання. В розділі матеріали і методи дослідження Дисертант детально описує розроблену ним особисто модель контузійного пошкодження ока у кроля. Експериментальну контузію ока у кролів, викликану дією потоку вуглекислого газу під тиском, моделювали за власно створеною методикою із використанням газобалонного пневматичного пістолету марки «Байкал МР-654К» (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) з використанням балонів вуглекислого газу (маса зрідженого CO₂ - 12 г) під тиском (Crosman, США, № серії 456739). Постійність тиску CO₂ на рівні дульного зрізу контролювали шляхом попередньої реєстрації швидкості польоту сферичної сталюї кульки (Crosman, США, № серії 03675482), калібром 4,5 мм та масою 0,3 г на відстані 1 см від внутрішнього дульного отвору через індукційний надульний хронометр Х 741 (Україна). Для уніфікованого підходу при створенні контузії різного ступеня тяжкості, відстань дії уражуючого агенту послідовно змінювали від 0 до 1 см (постріл впритул, з відстані 0,5 см та 1 см) до центра рогівки. Розроблені критерії оцінки величини та характеристики ступенів контузії в залежності від

відстані пострілу за змінами активності та рівня в сироватці крові нейромаркерів цитодеструкції, а саме нейрон-специфічної енолази (NSE) та білку S 100 (S100). Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані вимоги біоетики згідно до Національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей». Дисертантом розроблено підхід в декілька етапів до оцінки нейропротективної дії мелатоніну та референт-препаратів, що дозволило об'єктивно оцінити їх вплив на основні показники ішемії, апоптозу, оксидативного стресу, порушення локальної гемодинаміки внаслідок контузійного пошкодження ока. В роботі використовували сучасні фізіологічні, фармакологічні, біохімічні, імуногістохімічні, цитометричні та статистичні методики. В третій главі Автором показано, що розроблена власноручно модель контузійної травми зорового аналізатора у кролів, яку викликають дією потоку вуглекислого газу під тиском при холостому пострілі із пневматичного пістолету, призводить до підвищення в залежності від ступеня контузії нейромаркерів цитодеструкції в сироватці крові: активності нейрон-специфічної енолази та рівня білку S 100. За допомогою отриманих результатів активності нейромаркерів, при збільшенні відстані пострілу від 0 см до 1,0 см до центру рогівки ока кролів, було запропоновано класифікацію важкості контузії: важкого, середнього та легкого ступеню. Модель контузії важкого ступеню відтворювалась при холостому пострілі із пневматичного пістолету впритул до центру рогівки ока кролів. Проведене дослідження показало, що вже через добу після моделювання патології, мали місце суттєві морфологічні зміни в цитоархітектоніці зорового аналізатора (підвищилась активність нейрон-специфічної енолази в 43,3 рази), які зберігались, щонайменше, упродовж перших 7-ми діб (зріс рівень білку S 100 в 39,7 рази). При мікроскопії гістопрепаратів зорового нерва, на сьому добу візуально помічені явища деструкції та нейродегенеративних змін. Отримані дані вказують на

адекватність даної моделі для відтворення контузії ока, яка супроводжується вірогідними деструктивними змінами в нейронних структурах ока. Всі досліджувані речовини, як мелатонін дозою 10 мг/кг, так і обрані референс-препарати, сприяли вірогідному зменшенню, відносно тварин групи контрольної патології, активності NSE в кінці першої доби експериментальної контузії органу зору. Це вказує на наявність у них нейроретинопротективної активності. За спроможністю зменшувати активність NSE, тобто за величиною нейроретинопротективної дії, через 24 години після моделювання контузійної травми органу зору у кролів, досліджувані препарати можна розташувати у наступній послідовності: тіотриазолін (100 мг/кг) < корвітин (10 мг/кг) < цитиколін (250 мг/кг) < мелатонін (10 мг/кг). Таким чином, мелатонін, цитиколін, корвітин та тіотриазолін є різноступеневими носіями нейроретинопротекторної активності. Семиденне курсове введення мелатоніну в дозах 5, 10 та 15 мг/кг, так само як і референс-препаратів цитиколіну (250 мг/кг), корвітину (10 мг/кг) або тіотриазоліну (100 мг/кг), достовірно не впливало на середні значення BOT у кролів без офтальмопатології. Це доводить, що досліджувані препарати можна застосовувати не зважаючи на те, яким внутрішньоочним тиском супроводжується та чи інша офтальмопатологія. Серед препаратів порівняння, за спроможністю стабілізувати падіння BOT, відносно контрольної патології, найбільш ефективним у всі часові проміжки виявився корвітин, семиденна терапія яким сприяла вірогідному зростанню BOT відносно цитиколіну та тіотриазоліну в середньому відповідно на 42,9% та 66,7% ($p < 0,05$), поступаючись при цьому за досліджуваним параметром мелатоніну дозою 10 мг/кг в середньому на 11,7% ($p < 0,05$). Проведене скринінгове дослідження мелатоніну у дозах 5, 10 та 15 мг/кг, при його використанні за новим призначенням в умовах експериментальної контузії ока, за показниками активності маркера NSE та BOT, дозволило виявити його умовно-терапевтичну дозу - 10 мг/кг, придатну для подальшої поглибленої оцінки його нейропротекторної дії.

У четвертій главі Автором встановлено, що за даними протоково-цитометричного аналізу, семиденна курсова терапія мелатоніном кролів з контузійною травмою ока, за спроможністю зменшувати відсоток клітин з ознаками фрагментації ДНК, переважає цитиколін в середньому на 35,4%, що свідчить про наявність у нього антиапоптотичної дії. Отже, мелатонін зменшує як некробіотичні так і апоптотичні процеси в сітківці кролів в умовах контузії зорового аналізатора, що є одним із механізмів його нейропротекторної дії. За величиною антиапоптотичної дії на клітини ендотелію рогівки та клітини епітелію кришталика мелатонін перевершує тіотриазолін на 10,1% та 68,2% відповідно. Зважаючи на ці факти, ми можемо стверджувати, що антиапоптотична активність мелатоніну на клітини заднього епітелію рогівки та епітелію кришталика є одним із механізмів його цитопротекторної дії. Наприкінці терапії модельної контузії ока всі досліджувані препарати сприяли вірогідному зменшенню, відносно тварин групи контрольної патології, рівня S100. За величиною антинейрогліопроліферативної дії мелатонін достеменно переважає цитиколін на 20,7%, корвітин на 31,5% та тіотриазолін на 39,3%, а, отже, досліджувані препарати можна розташувати у наступній послідовності: тіотриазолін (100 мг/кг) < корвітин (10 мг/кг) < цитиколін (250 мг/кг) < мелатонін (10 мг/кг). Виявлені переваги цитиколіну над рештою референтів за обраним критерієм (верифікація титрів нейромаркеру S100) є закономірними, оскільки основна мішень його дії - нейрони та нервові волокна. На тлі терапії контузії ока у кролів мелатоніном та цитиколіном, відсоток ядер в суспензії клітин сітківки, що перебувають у фазі S (нейрогліальна проліферація), була вірогідно меншою, відносно цього показника у групі контрольної патології, в середньому на 54,7% та 18,7% відповідно. Відповідно при цьому, мелатонін переважає цитиколін в середньому на 44,3% . Збереження цитоархітектонічної цілісності структур ЗН на тлі терапії мелатоніном або цитиколіном є свідченням наявності у них нейроцитопротективної дії. При цьому, світлова порівняльна мікроскопія

гістопрепаратів *nervus opticus* являє собою візуальне, якісне підтвердження тим кількісним числовим характеристикам, які ми отримали при цитометричному та імуноферментному аналізі.

В п'ятій главі Комнацька К.М. продемонструвала, що експериментальна семиденна терапія контузійної травми органу зору у кролів мелатоніном дозою 10 мг/кг в/в вірогідно ліпше за референс-препарат корвітин (10 мг/кг) або цитиколін (250 мг/кг), сприяла відповідно зниженню рівня глутамату на 24,4% і 21,9%, зменшенню вмісту стабільних метаболітів NO на 40,3% та 24,8% при паралельному збільшенні АТФ на 51% і 15,7%, послабленню процесів оксидативного стресу, на що вказувало вірогідне зменшення рівнів маркерів МДА на 30,1% та 15,7%, КГП на 31,2% та 11,6% на тлі достовірного зростання активності ГПО на 24,4% та 10,4% ($p < 0,05$). За спроможністю нормалізувати внутрішньоретинальний метаболізм мелатонін умовно-терапевтичною дозою 10 мг/кг перевершує корвітин (10 мг/кг) або цитиколін (250 мг/кг). Провідні складові механізму метаболітотропної дії мелатоніну при модельній контузії ока характеризуються послабленням явища глутаматної ексайтотоксичності, відновленням енергопостачання сітківки (у т.ч. за рахунок нормалізації перебігу реакцій в циклі Кребса), модулювальним впливом на обмін NO, зниженням інтенсивності ПОЛ і ОМБ та активацією ферментативної ланки антиоксидантного захисту сітківки.

За даними лазерної доплерівської флоуметрії, курсове застосування мелатоніну, цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну стабілізувало стрімке погіршення кровопостачання, проте, за ступенем покращання перфузії, вони мали між собою вірогідну різницю. За показником мікроциркуляції, мелатонін достовірно перевершував найбільш активний препарат-порівняння корвітин на 1-шу, 4-ту та 7-му добу в середньому на 18,5%, 52,6% та 36,7% ($p < 0,05$). Слід відмітити, що саме у критичний період (4-та доба) відмічалась максимальна різниця в ефективності мелатоніну та корвітину. Отже, покращення перфузії ока в умовах його контузії на тлі застосування мелатоніну - один із провідних механізмів в реалізації його

нейропротекторної дії. В шостій главі Автор аналізує і обговорює отримані експериментальні дані і робить висновок, що результати експериментально обґрунтовують доцільність застосування мелатоніну в терапії контузії зорового аналізатора, створення його нової лікарської форми, з метою впровадження препарату в практичну систему охорони здоров'я за новим призначенням, а саме як нейропротектора при контузійній травмі органу зору, та внесення змін по розширенню показів до його застосування в офтальмологічній практиці. Співставлення встановлених нами нових фармакодинамічних характеристик нейропротекторної дії мелатоніну з патогенезом ішемічно-гіпоксичного ураження ока (непрохідність судин сітківки та ЗН, глаукома, тощо) є підґрунтям для цілеспрямованої оцінки препарату за цим напрямком.

Застосований метод статистичного аналізу дав змогу правильно інтерпретувати експериментальні дані і зробити обґрунтовані висновки.

Таблиці та рисунки, які є в дисертації, логічно доповнюють її основний зміст. Достатня кількість використаних літературних джерел, глибина їх аналізу та вміле їх використання при написанні дисертації свідчать про хорошу орієнтованість автора в проблемах, вирішенню яких присвячена робота.

Висновки дисертації логічно випливають з результатів дослідження і повністю відповідають положенням, які були сформульовані в меті та завданні дослідження. Фактичний матеріал добре систематизовано. Робота написана чіткою науково-літературною мовою, список літератури складається, головним чином, із сучасних наукових джерел.

Зауваження:

1. У літературному огляді Автором не розкрита роль ендогенної нейропротекції при ішемічному пошкодженні органів і тканин.
2. У літературному огляді, в підглаві, мелатонін характеризується як препарат-кандидат для участі в експериментальній терапії контузійного ураження ока, Автор докладно описує антиоксидантний профіль

мелатоніну, але на жаль, не приводить його властивості, що дозволяють прогнозувати у нього нейропротективну активність.

3. Достатньо вивчено дію мелатоніну, спрямовану на підвищення експресії фактора ендогенної нейропротекції - білка теплового шоку 70 кДа. Однак, в дисертаційному дослідженні при оцінці нейропротективної дії мелатоніну і референс-препаратів цей маркер не вивчався, незважаючи на рекомендації ДЕЦ МОЗ України при оцінці даного виду активності.
4. При визначенні ED_{50} препарату трьох контрольних точок мало (необхідно 5-6).
5. Як молекулярний маркер нейродеструкції Автор не зовсім вдало вибрав білок S-100, який більшою мірою характеризує когнітивні порушення ЦНС, які Автор не вивчав.
6. На жаль, стан нітроксідергічної системи ока визначали тільки за концентрацією нітритів і нітратів, не залучаючи з цією метою рекомендовані ДЕЦ МОЗ України нітротирозин, активність і експресію nNOS, tNOS, iNOS, L-аргініну.
7. Не зовсім коректно судити про глутаматну ексайтотоксичність за концентрацією глутамату, для цієї мети рекомендовано визначати титр антитіл до феніклідинового сайту NMDA.
8. Не обґрунтована тривалість експериментальної терапії. 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.

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Лідером наукової школи фармакологів Вінницького національного медичного університету професором О.О.Ходаковським розроблені підходи до оптимізації нейропротективної терапії. Базуючись на даних цих досліджень, а також результатів інших вчених, визначте, який вид дії - рецепторний або метаболітотропний - залучено у мелатоніну для

переривання швидких і відтермінованих механізмів загибелі нейронів при контузії ока?

2. Вами вперше отримані дані про здатність мелатоніну в умовах ішемії підвищувати продукцію АТФ. Які механізми залучено до цього процесу? Цей механізм обумовлений прямим впливом мелатоніну на тонкі ланки енергетичного метаболізму, або є інші механізми?
3. При моделюванні контузійної травми ока різного ступеня тяжкості, який тип морфологічної загибелі клітин сітківки Ви реєстрували в більшій мірі - некроз або апоптоз? Які ендogenous фактори, на Вашу думку, регулюють перемикання одного типу загибелі клітин на інший? Яка роль в цьому плані мелатоніну?

Висновки

Дисертація Комнацької Катерини Миколаївни: «Нейропротективні ефекти мелатоніну при контузійній травмі ока (експериментальне дослідження)», є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання. За актуальністю, об'ємом, використанням методів досліджень, новизною отриманих даних дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, а дисертант заслуговує присвоєння шуканого ступеня за спеціальністю - 14.03.05 – фармакологія.

Завідувач кафедри фармакології та
медичної рецептури Запорізького державного
медичного університету
професор



І.Ф. Беленічев
[Signature]
[Signature]