

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора, завідувача кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України»

ЖИЛЮКА ВОЛОДИМИРА ІВАНОВИЧА

на дисертаційну роботу **ТЕМІРОВОЇ ОЛЕНИ АНАТОЛІЇВНИ**
«Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу» представлену для офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, яка надійшла до спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ ДИСЕРТАЦІЇ

Цукровий діабет (ЦД) залишається і ще тривалий час залишатиметься проблемою, що носить характер глобальної епідемії неінфекційної природи. Згідно інформації Міжнародної діабетичної федерації існує тенденція найбільшого розповсюдження діабету серед міського працездатного населення віком 40–59 років і без гендерних особливостей в країнах, що розвиваються. Прогнозується, щодо 2030 року кількість хворих з діагностованим діабетом сягне 552 млн. Згідно епідеміологічних даних, у 2017 році в Україні налічувалося 1,5 млн. хворих на цю патологію. Однак ці дані не можуть бути коректними, так як фактична поширеність діабету у нашій країні є вищою у 2 – 2,5 рази за рахунок недіагностованих випадків. Гостроту проблеми визначає надто стрімкий розвиток ускладнень, які стають причиною інвалідизації, погіршують якість життя та скорочують його тривалість у хворих на ЦД. Зокрема, розвиток стійких порушень когнітивно-мнестичних функцій ЦНС, які носять назву «діабетична енцефалопатія» може приводити до труднощів у розумінні інформації та інструкцій, що погіршує перебіг та прогноз, а також вносить суттєвий вклад в зниження якості життя та лікування хворих на діабет.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ, боротьба з ЦД повинна бути пріоритетним завданням національних систем охорони здоров'я. На превеликий жаль, можна констатувати, що і сьогодні забезпечення контролю рівнів глікемії при ЦД не є повною гарантією попередження розвитку ускладнень. Тому, основною стратегією боротьби є розробка програм направлених на профілактику ускладнень цієї ендокринної патології. Зважаючи на ключову роль оксидантного стресу в їх появі, оптимізація специфічної фармакотерапії діабету може бути досягнута шляхом включення засобів з антиоксидантними властивостями. Відповідно, доцільність вивчення N-ацетилцистеїну і мелатоніну за їх комбінованого введення в якості потенційних ЛЗ з нейропротекторною активністю при ЦД1 є обґрунтованою і актуальною у вирішенні одного з важливих завдань сучасної медицини – боротьбі з діабетичними ускладненнями.

Все вищесказане визначає наукову та практичну значущість дисертаційної роботи Темірової Олени Анатоліївни «Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу», а представлені наукові дані є актуальними і практично важливими.

ЗВ'ЯЗОК РОБОТИ З НАУКОВИМИ ПРОГРАМАМИ, ПЛАНАМИ, ТЕМАМИ

Дисертаційну роботу виконано в рамках ініціативно-пошукової науково-дослідної роботи кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України: «Фармакологічна органопротекція при експериментальному цукровому діабеті 1 типу» (№ державної реєстрації 0116U004221, 2016-2019 рр.), в якій авторка є співвиконавицею.

СТУПІНЬ ОБҐРУНТОВАНOSTІ НАУКОВИХ ПОЛОЖЕНЬ, ВИСНОВКІВ ТА РЕКОМЕНДАЦІЙ, СФОРМУЛЬОВАНИХ У ДИСЕРТАЦІЇ, ЇХ ДОСТОВІРНІСТЬ

Дисертаційна робота Темірової Олени Анатоліївни виконана на високому сучасному науково-методичному рівні. У дослідженні використано достатню кількість лабораторних тварин (226 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200-260 г.) та адекватних поставлених меті методів дослідження. Наукові положення і висновки базуються на методичних засадах, адекватних поставленим задачам, є експериментально обґрунтованими та логічно витікають із отриманих результатів власних досліджень.

Фактичний матеріал повною мірою ілюстрований таблицями та рисунками. Достатня кількість сучасних методів дослідження *in vivo* (фармакологічні, біохімічні, фізіологічні, квантово-хімічні, фізико-хімічні, морфологічні), а також статистичний аналіз, дозволили отримати результати, достовірність яких, не викликає сумнівів.

Усі дослідження проведені з дотриманням біоетичних норм і узгоджені Комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протоколи № 99 від 28 грудня 2016 р., № 127 від 02 грудня 2019 р.). Робота виконана на метрологічно повіреній дослідницькій апаратурі та повіреним інструментом.

Усе це дає підстави вважати, що наукові положення та висновки дисертації Темірової О.А. є цілком обґрунтованими та узгодженими з метою та задачами дослідження.

НОВИЗНА ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ВЛАСНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дисертантка вперше експериментально обґрунтовує доцільність комбінованого введення внутрішньошлунково N-ацетилцистеїну і мелатоніну в дозах 1500 мг/кг та 10 мг/кг відповідно та доводить, що таке сумісне введення лікарських засобів у зазначених дозах попереджує прогресування цукрового діабету 1 типу, адже зменшує рівень глікемії, нормалізує масу тіла та збільшує показник виживання.

Також в роботі доведено взаємопотенціювання антиоксидантної та нейропротекторної активності N-ацетилцистеїну та мелатоніну при

експериментальному цукровому діабеті 1 типу, а саме покращення функціонування мітохондрій головного мозку експериментальних тварин та гальмування реакції оксидативного стресу на тлі нормалізації системи оксиду нітрогену головного мозку в умовах експериментального цукрового діабету 1 типу.

Авторкою роботи встановлено, що комбіноване введення цих дослідних лікарських засобів у зазначених дозах сприяє активації астроцитарної глії сенсомоторної зони кори у дослідних тварин з інсулінзалежним діабетом.

Наукову новизну підтверджено патентами України на корисні моделі: № 130862 «Спосіб оцінки ефективності корекції ліпідного метаболізму при експериментальному цукровому діабеті 1 типу в щурів»; № 141173 «Спосіб оцінки ефективності нейропротекції в експерименті».

ТЕОРЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати дисертаційної роботи Темірової О.А. надають нові уявлення про молекулярні механізми дії N-ацетилцистеїну та мелатоніну і це дає можливість кращого розуміння фармакодинамічних особливостей цих препаратів і створює перспективи для подальших досліджень їхніх молекулярних мішеней при цукровому діабеті 1 типу.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виконана робота є фундаментальним дослідженням. Однак її результати становлять істотний практичний інтерес для сучасної фармакології, ендокринології та діабетології. Зокрема, на підставі проведених досліджень експериментально обґрунтовані перспективи комбінованого застосування відомих лікарських засобів N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу.

Отримані дані є теоретичним та експериментальним підґрунтям для подальших досліджень і проведення клінічних випробувань з метою розширення

знань про фармакодинаміку зазначених лікарських засобів та внесення змін до інструкції з їх медичного застосування.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ В ПРАКТИЦІ

Результати дисертаційної роботи мають практичне значення і можуть використовуватися у науковому процесі та при викладанні курсу фармакології студентам медичних закладів вищої освіти.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у практику наукових досліджень і навчальний процес на кафедрі фармакології НМУ імені О.О. Богомольця, кафедрі клінічної фармакології та внутрішньої медицини Харківського Національного медичного університету, кафедрі клінічної фармакології та клінічної фармації Вінницького Національного медичного університету імені М.І. Пирогова.

ПОВНОТА ВИКЛАДАННЯ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ В ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЯХ

Основні результати і нові наукові положення дисертації повністю відображені у публікаціях в наукових журналах та матеріалах наукових форумів.

За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 18 наукових праць: 6 статей, серед яких 4 – у наукових виданнях, рекомендованих МОН України, 2 – закордонних виданнях; 10 тез у матеріалах конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України на корисну модель.

СТРУКТУРА ТА ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

Дисертація Темірової О.А. викладена державною мовою на 204 сторінках комп'ютерного тексту та оформлена згідно офіційних вимог МОН України. Робота містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи дослідження», 4 розділи власних

досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки і список використаних джерел в кількості 319 найменувань, з них 102 – кирилицею та 217 – латиницею. Дисертація ілюстрована 14 таблицями та 41 рисунком.

Дисертаційна робота оформлена згідно вимог наказу №40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» і починається з анотації викладеної державною та англійською мовами.

У **вступі** дисертанткою логічно і послідовно обґрунтована доцільність проведення власного дослідження, викладена мета та завдання, окреслені предмет та об'єкт дослідження. Сформульована наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, відображений власний внесок та наведена інформація щодо апробації результатів досліджень.

В **огляді літератури** дисертантка дає оцінку епідеміології, етіології та патогенезу цукрового діабету, а також описує сучасні погляди на механізми розвитку енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу та ролі оксидативного стресу у її патогенезі. Авторка дає детальну характеристику світовому досвіду застосування антиоксидантів у комплексній терапії цукрового діабету 1-го типу та обґрунтовує доцільність власного експериментального дослідження нейропротекторних властивостей N-ацетилцистеїну та мелатоніну при вказаній патології.

У **другому розділі** «Матеріали та методи дослідження» Темірова О.А. представила дизайн дослідження та описала використані нею у ході виконання роботи патофізіологічні, біохімічні, морфометричні, гістологічні, імунофлюоресцентні та імуногістохімічні методи, а також метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР), імуноферментний аналіз, метод трансфекції генів, а також статистичний аналіз, які дозволили отримати нові наукові дані.

Третій розділ присвячений оцінці параметрів вуглеводного та ліпідного обміну, а також інтегральних показників за умов експериментального цукрового діабету 1 типу в щурів та на фоні введення досліджуваних препаратів. Дисертанткою визначено, що комбіноване введення N-ацетилцистеїну

(1500 мг/кг/добу, в/шл.) та мелатоніну (10 мг/кг/добу, в/шл.) знижувало рівень глікемії, нормалізувало масу тіла та збільшувало виживання тварин з експериментальним цукровим діабетом. При чому, застосування мелатоніну чинило також і гепатопротекторну дію за даних умов експерименту. Одночасно, дисертантом встановлено, що комбіноване застосування N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг/добу, в/шл.) та мелатоніну (10 мг/кг/добу, в/шл.) є безпечним.

У **четвертому розділі** розглянуті антиоксидантні властивості N-ацетилцистеїну та мелатоніну з використанням програмного забезпечення Prediction of Activity Spectra for Substances та проведення квантово-хімічних розрахунків *in silico*. Даними PASS прогнозу підтверджено доцільність подальшого експериментального вивчення N-ацетилцистеїну і мелатоніну при цукровому діабеті. Дослідженнями *in silico* дисертанткою визначено квантово-хімічні дескриптори антиоксидантної активності для молекул N-ацетилцистеїну і мелатоніну. При чому, комбіноване введення N-ацетилцистеїну та мелатоніну асоціювалося з кращим антирадикальним ефектом - пригніченням генерування супероксидного радикалу ($p < 0,01$) та збільшенням його утилізації у крові, а також ліпше нормалізовувало співвідношення церулоплазмін/трансферин та трансферин/метгемоглобін. Одночасно, самостійне та комбіноване введення N-ацетилцистеїну і мелатоніну збільшували біодоступність NO. N-ацетилцистеїн та його комбіноване введення з мелатоніном сприяли кращому відновленню жирнокислотного спектру ліпідів та вказує на мембранопротекторні властивості, тоді як мелатонін сприяв зменшенню інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів у крові.

П'ятий розділ висвітлює вплив самостійного та комбінованого введення N-ацетилцистеїну і мелатоніну на орієнтовно-дослідницьку активність та емоційну реактивність щурів з експериментальним цукровим діабетом 1 типу в тестах: «відкрите поле», «темно-світла камера», «діставання та виймання їжі». Дисертанткою встановлено, що моделювання стрептозотоцинового діабету призводило до пригнічення локомоторної та орієнтовно-дослідницької активності тварин у тестах «відкрите поле», «темно-світла камера». Окрім того,

перебіг цукрового діабету 1 типу супроводжувався зростанням тривожності тварин у тесті «темно-світла камера» та порушенням кортикоспинальної функції в тесті «діставання та виймання їжі». За даних змін, самостійне та комбіноване введення N-ацетилцистеїну і мелатоніну гальмувало розвиток когнітивного дефіциту, зменшувало прояви депресії, нормалізувало поведінкові реакції у тварин з експериментальним цукровим діабетом 1 типу.

Шостий розділ, присвячений оцінці впливу самостійного та комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну на функціональний стан електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, показники вільно-радикального пошкодження, активність ферментів системи антиоксидантного захисту, гістоморфометричні та ультраструктурні зміни в головному мозку щурів з метою вивчення їх нейропротекторного впливу за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу. У ньому дисертанткою визначено, що комбіноване застосування досліджуваних препаратів ефективно усувало зменшення рівня ЗСП-N2 та радикалів убіхінону і сприяло нормалізації електронно-транспортного ланцюга мітохондрій клітин головного мозку, сприяло зниженню рівня генерування CP та зростання рівня NO, а також зменшення вмісту 8-охоG в тканинах кори тварин з гіперглікемією. Також авторкою роботи визначено, що самостійне та комбіноване введення НАЦЦ і Мел мало активуючий вплив на САОЗ та сприяло компенсаторно-приспосувальним змінам в структурних елементах головного мозку щурів з експериментальним ЦД1.

Для наглядного відображення результатів, описи розділів супроводжуються мікрофотографіями, таблицями та рисунками.

Сьомий розділ, який присвячений аналізу та узагальненню результатів, викладений логічно та послідовно. Ознайомлення з ним створює враження цілісності виконаної роботи. Причому, дисертантка виявила здатність до глибокого осмислення отриманих результатів та їх ґрунтового аналізу і синтезу.

Чіткий стиль викладення результатів власних досліджень дозволив дисертантці систематизувати отриманий матеріал і зробити 6 висновків, що повністю відповідають поставленій меті та задачам.

Список літературних джерел складений у відповідності до діючих правил щодо оформлення бібліографічних посилань і вміщує 319 посилань (102 – кирилицею та 217 – латиницею).

НЕДОЛІКИ ДИСЕРТАЦІЇ ЩОДО ЇЇ ЗМІСТУ І ОФОРМЛЕННЯ

Дисертаційна робота виконана на високому науковому рівні, дає привід для дискусії, хоча і має деякі недоліки, які не зменшують загальної позитивної оцінки роботи, не стосуються її суті та наукових положень, які виносяться на захист і мають лише рекомендаційний характер:

1. У роботі не вказано за допомогою якого критерію проводилася попередня перевірка розподілу значень на нормальність.
2. Мало зрозумілим є спосіб видалення крові з мозку після його вилучення з черепної коробки.
3. Хотілося б побачити більш розширене і обґрунтоване пояснення вибору дослідних доз, особливо для скринінгових досліджень ефективності комбінацій N-ацитилцистеїну і мелатоніну на С.62.
4. Авторці доцільно було б надати інформацію по летальності тварин у групах в динаміці.
5. Складно зрозуміти твердження для комбінованого використання N-ацитилцистеїну і мелатоніну «...попереджує прогресування цукрового діабету 1 типу», адже рівні глікозильованого гемоглобіну були достатньо високими.
6. Дотепним було б узагальнення наприкінці 6 розділу.
7. Доволі складно усвідомити наскільки раціональною є вивчена комбінація дослідних засобів, адже за більшістю ключових критеріїв вона поступається монотерапії N-ацитилцистеїну чи мелатоніну.
8. У розліді 6 зазначається, що самостійне та комбіноване застосування досліджуваних препаратів також сприяло зростанню продукції NO нейрональною NOS..., хоча у підсумку підрозділу дисертантка вказує про «Зростання рівня NO у 2,0 рази може свідчити про ендотеліопротекторну дію

комбінованого застосування N-ацетилцистеїну чи мелатоніну у тканинах головного мозку щурів з ЦД1». Яким чином, використаний метод оцінки рівнів оксиду азоту, може вказувати на його походження? А якщо це продукт індукцибельної синтази азоту?

9. На с. 150. (Розділ аналіз та узагальнення результатів дослідження) зазначається ... структурні зміни полягали у зменшенні щільності нейронів, їх деформації та гіперхроматозі. Хоча у розділі 6 дисертації, дані про щільність нейронів відсутні.

10. Висновок 5 неповною мірою обґрунтовує нейропротективні властивості дослідної комбінації.

11. У роботі зустрічаються поодинокі орфографічні та стилістичні помилки (напр. с. 128 – «кількість» замість «кількісні», с. 140 – «стимуляціоє поліферації» замість «стимуляцією проліферації», с. 143 – «тварини» замість «тварин», с. 152 – «нейропотекторний» замість «нейропротекторний»), русицизми (с. 134 – «мілкі» замість «дрібні»).

У порядку дискусії під час офіційного захисту вважаю за доцільне дисертантці відповісти на наступні запитання:

1. Чим обґрунтоване тривале введення N-ацетилцистеїну у дозі 1500 мг/кг та вибір доз препаратів для комбінованого використання? Чи існують дані щодо токсикології подібних доз N-ацетилцистеїну при тривалому використанні?

2. Як Ви вважаєте, яким чином астроглія попереджує розвиток неврологічних та когнітивних порушень у дослідних тварин? Адже морфометричні показники у групі N-ацетилцистеїн/Мелатонін знаходяться на рівні значень тварин з діабетичною патологією. Можливо це є ознаки компенсаторного реактивного астрогліозу?

3. З чим може бути пов'язана доволі виразна гіпоглікемічна дія N-ацетилцистеїну та Мелатоніну, але не їх комбінації при експериментальному діабеті 1 типу.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Олени Анатоліївни Темірової «Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу», яка виконана в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України, є завершеною науково-дослідною працею. Дисертація оформлена належним чином, містить нові, раніше незахищені науково обґрунтовані положення з фармакології, які є експериментально підтвердженими передумовами для оптимізації медикаментозної терапії неврологічних порушень у хворих з ЦД1, шляхом використання N-ацетилцистеїну та мелатоніну.

За актуальністю, сучасним методичним рівнем виконання дисертаційної роботи, новизною і практичним значенням отриманих результатів, обґрунтованістю наукових положень і висновків, їх достовірністю та повнотою викладу в опублікованих працях, а також відсутністю ознак академічної недоброчесності, дисертаційна робота Темірової О.А. відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. за №567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Завідувач кафедри фармакології
і клінічної фармакології Державного
закладу «Дніпропетровська медична
академія Міністерства охорони
здоров'я України»,
доктор медичних наук, професор



Жилюк В. І.