

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора Супрун Еліни Владиславівни на дисертаційну роботу **ТЕМІРОВОЇ Олени Анатоліївни «Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу»**, 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 Темірової Олени Анатоліївни присвячена актуальній проблемі сучасної медицини та фармації – розробці нових ефективних медикаментозних засобів лікування енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу з прямою антиоксидантною дією.

Актуальність теми. Цукровий діабет (ЦД) – неухильно прогресуюче захворювання, що вражає переважно осіб працездатного віку і швидко приводить до розвитку системних ускладнень. ЦД посідає третє місце в статистиці смертності після серцево-судинних і онкологічних захворювань. Актуальність їх пояснюється значною часткою в структурі захворюваності та летальності населення, тимчасової непрацездатності та інвалідності.

Велика кількість етіологічних та патогенетичних факторів формування енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу диктує необхідність подальших досліджень механізмів розвитку неврологічних ускладнень ЦД, 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 можливості та особливості дії, без спеціально розроблених підходів до їх використання, без планування стратегії лікування з позиції доцільності.

Отже, нейтропна дія перспективних препаратів повинна бути спрямована на відновлення морфологічних змін, переривання механізмів загибелі нейронів внаслідок попередження утворення активних форм кисню, розвитку оксидативного стресу, дисбалансу цитокінів, порушень енергетичного, вуглеводного обміну, трофічної дисфункції, апоптозу.

Серед перспективних мішеней нейропротективної терапії звертає на себе синтетичний лікарський засіб N-ацетилцистеїн, який є муколітиком та виявляє антиоксидантні властивості, та лікарського засобу з групи гіпнотиків – мелатонін. Робота присвячена саме обґрунтування доцільності

N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення в якості потенційних лікарських засобів з нейропротекторною, 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 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.).

Дисертант є співвиконавцем вищезазначеної теми.

Результати досліджень, представлених в дисертації, обґрунтовані об'ємним і достовірним матеріалом. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів фармакологічних, біохімічних, фізіологічних, квантово-хімічних, фізико-хімічних, морфологічних 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 201 сторінці машинописного тексту, містить анотації українською та англійською мовами, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, обговорення результатів, а також висновків та списку використаних літературних джерел. Дисертація ілюстрована 14 таблицями та 41 рисунком. Список використаних джерел налічує 319 найменувань (217 – латиницею).

За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, у тому числі 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.

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 енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу та шляхи пошуку

ефективного застосування антиоксидантів у комплексній терапії цукрового діабету 1-го типу і складається з чотирьох підрозділів: «Сучасні погляди на механізми розвитку енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу», «Роль оксидативного стресу у патогенезі енцефалопатії при цукровому діабеті 1-го типу», «Застосування антиоксидантів у комплексній терапії цукрового діабету 1-го типу» та «Обґрунтування доцільності експериментального вивчення нейропротекторних властивостей N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1-го типу». Проаналізовано всі етапи розвитку діабетичної енцефалопатії (ДЕ), взаємопотенціювання дії один одного, призводять до важких функціонально-морфологічних пошкоджень структур головного мозку.

Так, частота ДЕ серед пацієнтів із ЦД коливається від 5 до 80%, та вчистому вигляді ДЕ, як дисметаболічний розлад, спостерігається переважно в молодих пацієнтів із ЦД1, оскільки зі збільшенням віку пацієнта та тривалості захворювання починають прогресувати церебральні судинні порушення, зумовлені розвитком артеріальної гіпертензії, дисліпідемії, автономної нейропатії. Когнітивна дисфункція, що має широкий діапазон – від легких когнітивних порушень до розвитку деменції, є одним із хронічних ускладнень ЦД. Клінічно значуща когнітивна дисфункція призводить до порушення соціальної адаптації та погіршення якості життя пацієнтів ЦД, особливо, якщо вона досягає стадії деменції. Гострота проблеми обумовлена тим, що когнітивні порушення знижують здатність пацієнтів до адекватного контролю глікемії, збільшують ризик типових ускладнень, що призводять до інвалідизації та загрожує життю пацієнтів.

Важливим фактором у виникненні та прогресуванні ДЕ є порушення обміну глюкози. Так, глюкоза є джерелом енергії для ГМ і мітохондрії є найважливішим місцем для її аеробного окислення. Однак, гіперглікемія призводить до розвитку оксидативного стресу (ОС) у мітохондріях ЦНС. Також встановлено, що гіперглікемія призводить до накопичення лактату – продукту анаеробного розпаду глюкози при ішемії, що посилює ацидоз та сприяє дисбалансу внутрішньоклітинного гомеостазу. Оксидативний стрес, викликаний гіперглікемією, спричиняє надмірне утворення супероксидних радикалів (СР) та виснаження системи антиоксидантного захисту (САОЗ). Отже, важливим є подальше вивчення механізмів розвитку енцефалопатії при цукровому діабеті 1 типу та пошуку нових терапевтичних схем для попередження та лікування даної патології.

Головний мозок контролює функціонування органів та метаболізм через узгоджену дію нейронів та гліальних клітин. Для нормального функціонування він потребує великої кількості енергії, основними джерелами якої є глюкоза та функціонування мітохондрій. Ініціатором ОС при ДЕ вважають гіперглікемію, яка посилює утворення вільних радикалів та одночасно знижує рівень антиоксидантів (АО). Зокрема, за високого рівня глюкози затримується генерація глутатіону, знижується активність СОД, КАТ, глутатіонпероксидази. Важливим проявом токсичної дії АФК є

активація ПОЛ, кінцевим результатом якого є руйнування ліпідного біошару мембран з утворенням токсичних продуктів. Мітохондрії є важливим внутрішньоклітинним джерелом АФК, посилення генерування яких спостерігається за умов ішемії та залежить від ступеня блокування дихального ланцюга. З огляду на ключову роль мітохондрій у функціонуванні клітин, мітохондріальна дисфункція пов'язана з патогенезом багатьох захворювань. Саме мітохондріальна дисфункція є основою когнітивного дефіциту при ЦД1, що обґрунтовує доцільність застосування в комплексній терапії діабетичної енцефалопатії лікарських засобів з антиоксидантними та нейропротекторними властивостями, регуляторами процесу апоптозу, індукторів нейрогенезу та ін.

Пусковою ланкою загибелі нейронів є енергетичний дефіцит, що ініціює глутамат-кальцієвий каскад: вивільнення збуджувальних аміноацидергічних нейротрансмітерів – аспартату і глутамату та внутрішньоклітинне накопичення іонів кальцію. Первинна нейропротекція спрямована на переривання швидких механізмів некротичної смерті – реакції глутамат-кальцієвого каскаду (антагоністи NMDA- та AMPA-рецепторів, блокатори кальцієвих каналів). Серед засобів вторинної нейропротекції важливе практичне значення мають ЛЗ ноотропної дії, які умовно поділяють на ноотропи прямої дії («справжні» ноотропи) та нейропротектори з ноотропною дією. Основою профілактики та лікування центральної діабетичної нейропатії є корекція вуглеводного обміну та досягнення нормоглікемії, адже ГМ є глюкозо-залежним органом, функціонування якого порушується в умовах як гіпер- так і гіпоглікемії.

Оскільки ОС є одним з основних механізмів виникнення діабетичної нейропатії, широко розглядаються фармакологічні підходи, які направлені саме на попередження та корекцію ОС. Антиоксиданти (АО) – речовини, які виявляють здатність вступати у взаємодію з різними окисниками, АФК, іншими вільними радикалами, та спричиняти їх повну або часткову інактивацію – за механізмом дії всі АО поділяються на первинні (запобігають утворенню нових вільних радикалів) та вторинні (здатні захоплювати наявні радикали), за походженням поділяють на дві групи – ферментативної та неферментативної природи. Дослідження синтетичних аналогів ендогенних АО є одним із перспективних напрямків розроблення ЛЗ у якості нейропротекторів, оскільки пропоновані речовини є потенційно безпечними, мають досить широкий терапевтичний діапазон та мінімальний ризик розвитку побічних ефектів. Важливим є подальше обґрунтування доцільності експериментального вивчення нейропротекторних властивостей N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1-го типу.

N-ацетилцистеїн (НАцц) є похідним амінокислоти цистеїну, що виявляє потужні антиоксидантні властивості. Терапія НАцц, у шурів з експериментальним ЦД1: нормалізувала гіперглікемію та гіпоінсулінемію; знижувала рівень аланінамінотрансферази (АлАТ) та сечовини в сироватці крові; підвищувала активність печінкових ферментів САОЗ. НАцц має

нефропротекторний вплив, за умов експериментального ЦД1, контролюючи оксидативний та нітрозативний стрес через відновлення рівня NO.

Мелатонін (Мел) широким спектром біологічних ефектів: снодійним, антиоксидантним, протипухлинним, адаптогенним, антистресовим, антидепресивним, імуномодуючим, проте механізм дії Мел залишається до кінця не вивченим. Антиоксидантні властивості Мел роблять його ефективним компонентом програми попередження загибелі клітин, у наслідок некрозу або апоптозу, під впливом різних ксенобіотиків. Ці дані обґрунтовують доцільність вивчення N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу.

Аналіз літературних даних дозволив виділити N-ацетилцистеїн та мелатонін, які потенційно можуть нормалізувати гіперглікемію та гіпоінсулінемію та попередити формування ДЕ. Проведений аналіз літературних даних обумовлює перспективність і доцільність дослідження обраних препаратів і речовин з метою встановлення механізмів нейропротекторної дії при експериментальному ЦД.

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: N-ацетилцистеїн (АЦЕСТАД, шипучі таблетки, 600 мг, виробництво Stada Arzneimittel AG, серія: 63034), мелатонін (Віта-мелатонін, таблетки, 3 мг, ПАТ «Київський вітамінний завод», серія: DD90817). Дослідження проведені на 226 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200-260 г.

Дисертант в своїх експериментах використала дуже широкий набір експериментальних підходів для вирішення поставленої мети, яку він сформулював наступним чином: «Експериментально обґрунтувати застосування N-ацетилцистеїну і мелатоніну за їх комбінованого введення для нейропротекції при цукровому діабеті 1 типу».

Відтворення експериментального еквіваленту цукрового діабету 1 типу (ЦД1) у тварин здійснювали введенням стрептозотоцину (Streptozotocin, порошок, 500 мг, Sigma, США, SO130-500MG) у дозі 50 мг/кг одноразово інтраперитоніально відповідно до медичних рекомендацій [Стефанов О. В., 2001]. Через 72 год. після ін'єкції стрептозотоцину дослідним щурам вимірювали рівень глюкози крові хвостової вени, використовуючи глюкометр One Touch Select Simple (LifeScan, США). До експерименту включали тварин, що мали стійку гіперглікемію з рівнем глюкози більше ніж 15 ммоль/л.

На першому етапі дослідження дослідних тварин було розділено на групи: ІК (інтактний контроль, група інтактних щурів, які отримували 0,9% фізіологічний розчин); КП (контрольна патологія, група тварин з експериментальним ЦД1, які отримували 0,9% фізіологічний розчин); НАЦ (група щурів з експериментальним ЦД1, які отримували N-ацетилцистеїн у дозі 1500 мг/кг); Мел (група щурів з експериментальним ЦД1, які

отримували мелатонін у дозі 10 мг/кг); Comb1 (група тварин з експериментальним ЦД1, комбінованого введення N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг) та мелатоніну (10 мг/кг)); Comb2 (група тварин з експериментальним ЦД1, комбінованого введення N-ацетилцистеїну (750 мг/кг) та мелатоніну (5 мг/кг)); Comb3 (група тварин з експериментальним ЦД1, комбінованого введення N-ацетилцистеїну (375 мг/кг) та мелатоніну (2,5 мг/кг)). Після проведення досліджень на першому етапі, з вибору найбільш оптимальної дози комбінованого введення НАцц та Мел, дослідні щури були розділені на такі групи: ІК, КП, НАцц, Мел, НАцц+Мел (група тварин з експериментальним ЦД1, комбінованого введення НАцц (1500 мг/кг) та Мел (10 мг/кг)).

Вплив досліджуваних препаратів на інтегративні показники функціонування центральної нервової системи вивчали в тестах «відкрите поле», «темно-світла камера», «діставання та виймання їжі». Взяття крові та тканин головного мозку для досліджень здійснювалося на 50-ту добу після ін'єкції стрептозотоцину. Загальноприйнятими методами вивчали загальну концентрацію в крові щурів глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), холестерину (ХС) та тригліцеридів (ТГ), аланінамінотрансферази (АлАТ), аспаратамінотрансферази (АсАТ).

Проводили аналіз жирнокислотного складу в сироватці крові та тканинах головного мозку, інтенсивність ліпопероксидації визначали за накопиченням тіобарбітурат-активних продуктів, стан антиоксидантного захисту тканин головного мозку також оцінювали за рівнем відновленого глутатіону (ВГ), дослідження стану електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій, рівні лактоферину (ЛФ), вільного заліза (ВЗ) в тканинах головного мозку. Швидкість генерування супероксидних радикалів (СР) мітохондріями головного мозку та нейтрофілами визначали методом ЕПР, швидкість генерування оксиду нітрогену (NO) мітохондріями головного мозку та нейтрофілами вимірювали за температури рідкого нітрогену. Визначали молекулярний маркер окисного пошкодження ДНК – 8-оксогуанін, рівні трансферину (ТФ), церулоплазміну (ЦП), метгемоглобіну (MetHb) та ВЗ. Морфометричний аналіз зрізів сенсомоторної кори проведено з використанням програмного забезпечення Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1) при збільшенні $\times 400$. Ультраструктурні зміни кори головного мозку вивчали методом електронної мікроскопії.

Прогнозування антиоксидантних властивостей для НАцц та Мел проводили за допомогою програми Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Квантово-хімічні параметри молекулярних структур НАцц та Мел *in silico* розраховували за допомогою програми HyperChem 8.0.8 з використанням напівемпіричного методу розрахунків PM3 (англ. Parameter Model 3).

Статистичну обробку отриманих даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою програм IBM SPSS Statistics Base version 22.0, Medstat, Microsoft Office Excel 2016.

Розділ 3 присвячений результатам власних досліджень впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на виживання, показники вуглеводного та ліпідного обміну у крові щурів з експериментальним ЦДІ.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на стан глікемії, динаміку маси тіла та виживання у щурів з експериментальним ЦДІ. Визначено, що індукція стрептозотоцину призвела до розвитку стійкої гіперглікемії порівняно з групою інтактних тварин, яка корелювала зі зменшенням маси тіла тварин. Встановлено гіпоглікемічну дію НАцц, Мел та Comb1 починаючи з 5-го тижня експерименту та зменшення летальності тварин у групах НАцц, Мел та Comb1 на 35%.

Дослідження впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на біохімічні маркери цукрового діабету, ліпідного обміну та процесів цитолізу у щурів з експериментальним ЦДІ довело, що зміни маркерів цукрового діабету при самостійному та комбінованому застосуванні НАцц і Мел пов'язане зі зниженням рівня HbA1c, активності маркерних ферментів цитолізу гепатоцитів у групі Мел: АлАТ на 28,3% та АсАТ на 13,4%.

Отримані результати дозволили автору зробити висновок, що самостійне та комбіноване введення НАцц (1500 мг/кг/добу) і Мел (10 мг/кг/добу) мало гіпоглікемічний ефект, сприяло нормалізації маси тіла та збільшення показника виживання.

4-й розділ присвячений дослідженню антиоксидантних властивостей N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення *in silico* та *in vivo*. Дослідженнями *in silico* було визначено квантово-хімічні дескриптори АОА для молекул Мел: енергію вищої зайнятої молекулярної орбіталі НОМО, - 8,42 eV; потенціал іонізації (IP), 8,42 eV; жорсткість η , 4,12 eV. Для молекули НАцц: НОМО, -9,43 eV; IP, 9,43; жорсткість η , 4,67 eV; дипольний момент μ , 2,66 дебай.

Дослідження впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на швидкість генерування супероксидних радикалів та синтезу оксиду нітрогену в крові щурів з експериментальним ЦДІ виявило, що комбіноване застосування НАцц та Мел сприяло зниженню швидкості генерації СР нейтрофілами в 3,7 раза порівняно з групою контрольної патології, а самостійне застосування НАцц та Мел в 1,9 та 1,7 раза поступалося відповідному показнику групи НАцц+Мел.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на жирнокислотний склад та стан процесів перекисного окиснення ліпідів сироватки крові щурів з експериментальним ЦДІ підтвердило, що комбіноване введення НАцц та Мел достовірно зменшувало суму НЖК на 43,7%, зменшуючи вміст міристинової (в 3,2 раза) пентадеканової (в 3,2 раза), гептадеканової (в 4,0 раза) та пальмітинової ЖК. таким чином, застосування НАцц та НАцц+Мел сприяло кращому відновленню ЖК спектру сироватки крові, що вказує на мембранопротекторні властивості.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на параметри антиоксидантного захисту у крові щурів з експериментальним ЦД1 виявило, що самостійне та комбіноване застосування НАцц і Мел збільшувало вміст ТФ в 2,0 раза, знижувало рівень ЦП на 23,6% та MetHb в 1,3 раза, знижувало вміст ВЗ в крові щурів у 1,2-1,4 раза.

Розділ 5 відведений визначенню впливу n-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на функціональну активність нервової системи у щурів з експериментальним ЦД1.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним ЦД1 у тесті «відкрите поле» на 7-му тижні експерименту виявило істотне погіршення локомоторно-дослідної активності тварин групи контрольної патології та негативний кореляційний зв'язок між рівнем глікемії та горизонтальною і вертикальною активністю. Комбіноване введення НАцц та Мел збільшило перетин як периферичних, так і центральних квадратів (у 1,4 та 2,7 раза), вертикальну активність (у 1,4 раза), нормалізувало вегетативні зміни.

Таким чином, встановлені відмінності показників орієнтовно-дослідницької активності в щурів з експериментальним ЦД1, групи КП, вказують на те, що зміни поведінкової діяльності тварин можуть бути пов'язані з розвитком ДЕ. Самостійне та комбіноване застосування НАцц і Мел сприяло збільшенню орієнтовно-дослідницької активності та нормалізації вегетативної поведінки щурів з експериментальним ЦД1.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на поведінку щурів з експериментальним ЦД1 в тесті «темно-світла камера» дозволило встановити, що на 7-му тижні тварини групи контрольної патології мали високі показники тривожності, але низькі показники пізнавальної активності. Самостійне та комбіноване застосування НАцц і Мел зменшувало тривожність та збільшувало пізнавальну активність тварин з ЦД1: зростав час перебування в світлому відсіку (в 2,8, 2,4 та 2,9 раза), кількість виглядань з темного відсіку (в 3,0, 2,9, та 2,1 раза) та вертикальних стійок.

Отримані результати дозволили зробити висновок, що самостійне та комбіноване введення НАцц і Мел мало антидепресивну та стреспротекторну дію, сприяло зростанню орієнтовно-дослідницької активності щурів з експериментальним ЦД1.

Дослідженням впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на поведінку щурів з експериментальним ЦД1 в тесті «діставання і виймання їжі» встановлено, що експериментальні тварини мають менший відсоток успішних спроб діставання корму (в 1,7 раза), що може свідчити про порушення кортикоспинальної функції. Самостійне та комбіноване застосування НАцц і Мел у щурів з експериментальним ЦД1 сприяло збільшенню відсотка успішних спроб в 1,6 раза.

Автор робить висновок, що перебіг цукрового діабету 1 типу супроводжувався зростанням тривожності тварин у тесті «темно-світла камера» та порушенням кортикоспинальної функції в тесті «діставання та виймання їжі», в той час як самостійне та комбіноване застосування НАцц і Мел гальмує розвиток когнітивного дефіциту, зменшує прояви депресії, нормалізує поведінкові реакції у тварин з експериментальним ЦДІ.

Розділ 6 присвячений дослідженню нейропротекторних властивостей n-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення в головному мозку щурів з експериментальним ЦДІ.

Вивченням впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на функціональний стан електрон-транспортних систем мітохондрій клітин головного мозку щурів з експериментальним ЦДІ встановлено, що комбіноване застосування НАцц та Мел ефективно усувало зменшення ЗСП-N2 та радикалів убіхінону (в 2,0 раза в порівнянні з групою контрольної патології), сприяючи нормалізації ЕТЛ мітохондрій.

Дослідженням впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на показники вільно-радикального пошкодження та рівень оксиду нітрогену в тканинах головного мозку щурів з ЦДІ доведено, що комбіноване введення НАцц та Мел знижувало швидкість генерування СР на 40,9% та збільшувало рівень NO в 2,0 раза порівняно з групою контрольної патології, а також зменшувало вміст 8-охоG (в 2,0 рази в тканинах головного мозку та 3,7 раза в сечі).

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на жирнокислотний склад та стан процесів перекисного окиснення ліпідів в головному мозку щурів з експериментальним ЦДІ продемонструвало знижувало вміст ТБК-АП в 2,3 раза ($p < 0,01$) та відновлювало ЖК спектр в тканинах головного мозку на тлі комбінованого застосування НАцц та Мел.

Вивчення впливу N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінованого введення на параметри антиоксидантного захисту тканин головного мозку щурів з експериментальним ЦДІ виявило, що комбіноване введення НАцц+Мел збільшувало активність СОД в 1,8 раза, при цьому введення НАцц збільшувало рівень ВГ в 1,8 раза, а Мел – активність КАТ в 1,6 раза.

Як свідчать результати гістоморфометричних досліджень, експериментальний ЦДІ призводить до нейродистрофічних змін кори головного мозку, що виявляється у зменшенні щільності нейронів та їх деформації. Введення НАцц та Мел впливає на розвиток компенсаторно-приспосувальних змін практично в усіх структурних компонентах кори – сприяє збереженню більшої кількості нейронів, збільшенню їх площі, що вказує на його нейропротекторну дію.

Електронно-мікроскопічне дослідження кори півкуль великого мозку групи КП у порівнянні з ІК, свідчить про виражені зміни її структурних елементів та зміни астроцитарної глії – змінювалися синаптичні з'єднання, ушкодженням органел метаболічного плану, розширенням каналців

ендоплазматичної сітки, активація аутофагосом. Комбіноване введення NАцц та Мел показало збільшення кількості гліальних клітин – астроцитів.

Отримані дані є експериментально-теоретичним обґрунтуванням доцільності комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну для нейропротекції при цукровому діабеті 1 типу.в в якості засобів первинної та вторинної нейропротекції.

Наукова новизна отриманих результатів. Ступінь новизни роботи високий, оскільки мова йде про підвищення ефективності лікування діабетичної енцефалопатії при ЦД1 шляхом застосування в якості засобів нейропротекції препаратів N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комплексного використання.

Вперше експериментально обґрунтовано доцільність щоденного комбінованого введення внутрішньошлунково N-ацетилцистеїну і мелатоніну в дозі відповідно 1500 мг/кг та 10 мг/кг та встановлено, що комбіноване введення таких лікарських засобів у зазначених дозах попереджує прогресування цукрового діабету 1 типу: зменшує рівень глікемії, нормалізує масу тіла та збільшує показник виживання.

В роботі доведено потенціювання антиоксидантної та нейропротекторної активності при експериментальному цукровому діабеті 1 типу комбінованого застосування N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг/добу) та мелатоніну (10 мг/кг/добу), 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.

Встановлено, що комбіноване введення цих лікарських засобів у зазначених дозах сприяє активації астроцитарної глії сенсомоторної зони кори й тим самим попереджує розвиток неврологічних та когнітивних порушень у дослідних тварин.

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».

Практичне значення отриманих результатів роботи полягає у тому, що вперше експериментально обґрунтована перспектива застосування відомих лікарських засобів N-ацетилцистеїну, мелатоніну та їх комбінації у попередженні та лікуванні діабетичної енцефалопатії на ранніх стадіях ЦД1. Отримані результати можуть бути теоретичним та експериментальним обґрунтуванням для проведення клінічних випробувань з метою розширення фармакодинаміки зазначених лікарських засобів та внесення змін до інструкції до медичного застосування.

Запропоновано спосіб оцінки ефективності корекції ліпідного метаболізму при експериментальному цукровому діабеті 1 типу у щурів. Результати досліджень впроваджені в педагогічний процес та науково-

дослідну роботу на 4 кафедрах фармакології вищих медичних навчальних закладів України.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на IX Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини» (м. Вінниця, 16-17 листопада 2017 р.); III Міжнародній науково-практичній конференції «Медико-фармацевтичний форум – 2017» (м. Київ, м. Карлові-Вари, 22 грудня 2017 р.); 87-й науково-практичній конференції студентів та молодих учених з міжнародною участю «Інновації в медицині» (м. Івано-Франківськ, 22-23 березня 2018 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 28-29 березня 2018 р.); V Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів та молодих учених «BIMCO 2018» (м. Чернівці, 4-6 квітня 2018 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю “European Biomedical Young Scientists Conference NMAPE” (до 100-річчя заснування Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України) (м. Київ, 19-21 квітня 2018 р.); I науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (м. Харків, 18 жовтня 2018 р.); Всеукраїнській науковій конференції молодих учених «Медична наука – 2018» (м. Полтава, 16 листопада 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих учених “Annual Young Medical Scientists’ Conference” (м. Київ, 23-24 листопада 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні» (м. Одеса, 12-13 червня 2020 р.).

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.

Зміст автореферату повністю відбиває основні положення дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту й 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 рівней значущості ($p < 0,01$ та $p < 0,001$) при статистичних розрахунках в роботі наведено не у всіх відповідних випадках.

2. Відсутність використання при аналізі даних кореляційного аналізу між дослідженими показниками експериментальних груп між собою у всіх відповідних випадках.

3. В роботі зустрічаються друкарські, стилістичні та орфографічні 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. З даних літератури відомо, що активний вплив на формування ендотеліальної судинної дисфункції та в подальшому енцефалопатії при ЦДІ мають цитокіни, а саме розвиток «цитокінового дисбалансу» – гіперпродукція прозапальних цитокінів та відносний дефіцит протизапальних та ростових факторів. Чи проводили Ви досліді або існують літературні дані щодо впливу цитокінових препаратів на досліджені Вами параметри фармакологічної корекції неврологічних ускладнень ЦД?

2. Чи проводився системний статистичний аналіз кореляцій отриманих результатів експериментів щодо впливу самотійного та комбінованого застосування N-ацетилцистеїну і мелатоніну на показники вуглеводного та ліпідного обміну, системи антиоксидантного захисту в крові та тканинах головного мозку щурів? Які ланки-мішені на вашу думку є найбільш перспективними для нейропротекції з урахуванням отриманих Вами результатів дослідження?

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

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертація Темірової Олени Анатоліївни «Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу» 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 діабетичної енцефалопатії та впливу на ці процеси при експериментальному цукровому діабеті 1 типу потенційованної антиоксидантної та нейропротекторної активності комбінованого застосування N-ацетилцистеїну (1500 мг/кг/добу) та мелатоніну (10 мг/кг/добу).

Робота володіє практичним значенням, тому що розширення знань про фармакодинаміку відомих лікарських засобів N-ацетилцистеїну та мелатоніну та обґрунтовує доцільність застосування їх комбінації при цукровому діабеті 1 типу.

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 Темірової Олени Анатоліївни «Фармакологічне обґрунтування комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та мелатоніну при цукровому діабеті 1 типу», 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. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 (зі змінами), а її автор Темірова Олена Анатоліївна 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



Г.В. Супрун