

ВІДГУК

на дисертаційну роботу *Нефьодова Олександра Олександровича «Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту»*, представлену в спеціалізовану вчену раду Д.26.550.01 при Державній установі «Інститут фармакології та токсикології» на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - «фармакологія»

Актуальність теми. Розсіяний склероз (РС) – хронічне аутоімунне захворювання, при якому ушкоджується мієлінова оболонка нервових волокон головного і спинного мозку, є однією з найбільш поширених патологій нейродегенеративного характеру, що вражає переважно людей молодого працездатного віку (16-45 років) та швидко приводить до інвалідизації. Особливістю хвороби є одночасне ураження кількох різних відділів нервової системи, що призводить до появи у хворих різноманітних неврологічних симптомів. Морфологічною основою хвороби є утворення так званих бляшок розсіяного склерозу – осередків руйнування мієліну (дем'єлінізації) білої речовини головного та спинного мозку.

Здобутки клінічної та експериментальної медицини останніх років дозволили з'ясувати механізми розвитку цієї патології, виділити нові нозологічні форми, розробити їх діагностичні критерії та вдосконалити фармакотерапію. Діагностика нейродегенеративних захворювань на ранніх етапах і використання сучасних лікарських засобів дозволяє впливати на прогноз перебігу хвороби та істотно поліпшити якість життя хворих.

Роботи останніх років свідчать про те, що не менше 2/3 пацієнтів із РС (від 50 до 80 %) в тій чи іншій мірі страждають від болю. Однак ефективна терапія больового синдрому при розсіяному склерозі є в повному обсязі невирішеним завданням. Проведені в Данії дослідження показали, що повноцінну знеболюючу терапію отримують тільки 42% хворих РС. Натепер немає єдиної думки на причини виникнення, механізми розвитку больового синдрому згідно з віком, статтю, тяжкістю хвороби. Досі залишаються дискусійними питання співвідношення болю і клінічних особливостей РС. До того ж, на сьогодні не існує єдиної систематизації больових синдромів при розсіяному склерозі, а також не висвітлені питання їх інформаційно-структурного аналізу: не виявлено жодного дослідження, спеціально присвяченого аналізу больового дебюту, можливості прогнозування перебігу захворювання в залежності від виду больового синдрому, який сформувався на початку хвороби.

Водночас автор наголошує, що нейродегенеративний характер захворювання дає підставу для раннього початку проведення нейропротективної терапії, яка «розшиватиме» найбільш «вузькі місця» нейропротективного та антиоксидантного захисту. Нейропротекція при розсіяному склерозі повинна забезпечити профілактику нейроапоптозу, підтримку нервових та гліальних клітин, які гинуть, а також регенерацію

ушкоджень та представляється як універсальний терапевтичний підхід в регуляції балансу імунних і нейротрофічних факторів за даної патології

Увагу дисертанта привернула доцільність комбінованого застосування класичних та ад'ювантних знеболюючих засобів і засобів медикаментозного захисту мозку з метилпреднізолоном як препаратом базової гормонотерапії за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. Шляхом поглибленого експериментального аналізу фармакодинамічних та фармакокінетичних властивостей знеболюючих та нейропротекторних засобів за умов базової гормонотерапії розсіяного склерозу автором визначені теоретичні передумови оптимізації фармакотерапії больового синдрому та медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

Все вище зазначене дозволяє вважати застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин» ефективним напрямком фармакотерапії больового синдрому, що сприяє збереженню достатнього антиноцицептивного потенціалу мелоксикаму та габапентину, а також позиціонувати композицію «метилпреднізолон-цитиколін» як стратегічний напрямок нейропротективної терапії ЕАЕ, що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієлану і карбіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект.

З огляду на вище вказане, дисертаційна робота Нефьодова Олександра Олександровича є актуальною: вона експериментально обґрунтовує доцільність комбінованої терапії больових синдромів з використанням неопіоїдних анальгетиків, антидепресантів та антиконвульсантів із базовою фармакотерапією розсіяного склерозу з метою підвищення ефективності антиноцицептивної терапії у хворих на розсіяний склероз та доводить високу ноотропну і нейропротективну активність фармацевтичної комбінації цитиколіну та метилпреднізолону.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» та є фрагментом НДР «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей знеболювальної та нейропротекторної медикаментозної терапії в умовах модельованої патології» (№ держреєстрації 0104U006269) і «Системна фармакологія неопіоїдних анальгетиків та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах патологічних станів» (№ держреєстрації 0114U000935).

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 373 сторінках комп'ютерного друку, складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, розділу, присвяченому аналізу й узагальненню результатів дослідження, висновків та списку посилань, який містить 334 джерела, серед яких 209 – кирилицею, 125 – латиницею. Дисертація ілюстрована 45 таблицями та 52 рисунками.

Оцінка змісту дисертаційної роботи

У вступі викладено актуальність наукового напрямку, мета і задачі дисертаційної роботи, наукова новизна і практична значущість отриманих результатів і описаний особистий внесок дисертанта у виконання дисертаційної роботи, вказано кількість публікацій за матеріалами дисертації, її обсяг і структура.

Огляд літератури. У літературному огляді представлені дані щодо особливостей перебігу больового синдрому при розсіяному склерозі та стратегічних напрямків нейропротекції цього захворювання. Показаний взаємозв'язок патологічних реакцій при розсіяному склерозі та розвитком ексайтотоксичності, окислювального стресу, мітохондріальної дисфункції та дефіциту нейротрофічних факторів, що ініціюють нейроапоптоз. Аналізуючи представлений матеріал, дисертант приходить до висновку, що можливості патогенетичного шляху для корекції демієлінізуючих ушкоджень нервової системи при РС далеко не вичерпані, на підставі чого автор робить висновок про необхідність пошуку комбінацій відомих препаратів, що могли б впливати на ці патогенетичні ланки.

З огляду на широкий спектр фармакологічних властивостей цитиколіну, дисертант обґрунтовує перспективність і актуальність його сумісного комбінованого застосування з метилпреднізолоном з метою оптимізації медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

У розділі 2 дисертантом описані об'єкти і викладені методики вивчення з використанням комп'ютерного прогнозу, фармакологічні, біохімічні, патофізіологічні, гістологічні методи та методи математичної статистики. Об'єктами досліджень є больовий і невропатичний синдром та когнітивна дисфункція за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін». Їх фармакологічну активність вивчали і порівнювали з дією різних (в залежності від поставлених задач) препаратів: парацетамол, диклофенак натрію, ібупрофен, лорноксикам, мелоксикам, целекоксиб, кеторолак, карбамазепін, топірамат, вальпроат натрію, габапентин, прегабалін, амітриптилін, флуоксетин, пароксетин, тразодон, альфа-ліпоева кислота, ніцерголін, донепезил і фіксована комбінація «В»-вітамінного комплексу нейровітан.

Експериментальні дослідження виконані на 518 статевозрілих білих нелінійних щурах та лінії Вістар обох статей масою 210-300 г з дотриманням міжнародних і національних рекомендацій біоетики. У дослідженні експериментальною моделлю розсіяного склерозу слугував експериментальний алергічний енцефаломієліт, що розвивався у лабораторних щурів за умов внутрішньошкірного введення гомогената головного, спинного мозку та периферичних нервів зі стимулятором Фрейнда: при цьому модельований алергічний енцефаломієліт, як і розсіяний склероз, супроводжується порушенням проникності ГЕБ і його функціональним ослабленням, периваскулярною запальною інфільтрацією в ЦНС, розвитком процесу демієлінізації, пошкодженням олігодендроцитів і

аксонів, локальною активацією гліальних клітин.

Сучасний методологічний рівень дисертаційної роботи підтверджує перелік методів, використаних для досягнення мети роботи.

Для оцінки поведінкових реакцій тварин використаний тест «відкрите поле», який дозволяє відносно швидко визначити фізіологічну реакцію на нове середовище та отримати багатогранну інформацію про рухову, дослідницьку та емоційну активність тварин. Аналіз інтегративних функцій головного мозку у щурів проведено в тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ).

Для оцінки антиноцицептивної активності знеболюючих засобів використаний метод електричного подразнення кореня хвоста щура, неврологічного дефіциту - метод реєстрації м'язового тону в тесті підтягування на горизонтальній перекладині.

Тактильну алодинію вивчали в модифікації філаментного тесту von Frey шляхом реєстрації тиску, при якому тварини відсмикували ліву задню лапу, уникаючи впливу наростаючих по силі стимулів. Оцінку проявів хімічної гіпералгезії проводили з використанням формалінового тесту, а вивчення проявів термічної гіпералгезії - з використанням тесту «гаряча пластина».

Інтенсивність вільнорадикального окиснювання ліпідів оцінювалася по накопиченню в тканинах кінцевого продукту цього процесу – малонового діальдегіду (МДА). Стан антиоксидантної системи визначався за активністю її ключового фермента – супероксиддисмутази (СОД).

Функцію мітохондрій оцінювали по відкриванню мітохондріальної пори (МПП) та мітохондріальному трансмембранному потенціалу (Ψ). Стан енергетичного обміну в гомогенатах мозку щурів оцінювали спектрофотометрично по вмісту лактату, пірувату, ізоцитрату, малату і аспартату. Проведене комп'ютерне прогнозування можливості комбінованого використання препарату широкого фармакологічного спектру – синтетичного глюкокортикоїда метилпреднізолону з представниками різних фармакологічних груп (нестероїдні протизапальні препарати – мелоксикам, антиконвульсант габапентин і цитиколін, який виявляє ноотропну та психостимулюючу дію).

Аналіз кислотно-основних властивостей речовин здійснювався з використанням програми ACD/pKaDB.

Для підтвердження ефективності дії комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін» проводили також морфометричні дослідження та гістологічний контроль. Для вивчення морфофункціонального стану нейронів гіпокампу гістологічні зрізи депарафінували за стандартною методикою. Зображення отримували на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) та за допомогою 8-бітної CCD-камери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина).

Морфометричний аналіз клітин гіпокампу здійснювали в

напівавтоматичному режимі за допомогою програми, розробленої в спеціалізованому середовищі програмування VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина).

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Шапіро-Уїлка). 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.

Для множинного порівняльного аналізу, за умов нормального розподілу, дослідні групи порівнювалися за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA та критерію Дункана. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона.

Використовували 3 рівня статистичної значимості відмінностей результатів досліджень – $p < 0,05$; $p < 0,01$ та $p < 0,001$. Критичне значення рівня статистичної значимості (p) приймалося $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

У розділі 3 дисертантом представлений порівняльний аналіз знеболюючого потенціалу НПЗЛЗ (диклофенаку натрію, ібупрофену, лорноксикаму, мелоксикаму, кеторолаку та целекоксибу) і анальгетика-антипіретика парацетамолу у тварин за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

Встановлено, що в ряду НПЗЛЗ (диклофенак натрію, целекоксиб, мелоксикам, лорноксикам та ібупрофен) максимальний протизапальний потенціал виявляв мелоксикам, котрий (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) характеризувався високим рівнем болетамуючої дії та знижував активність PGH-синтази в головному та спинному мозку у 2,0 ($p \leq 0,05$) та у 1,7 ($p \leq 0,05$) рази відповідно у порівнянні з показниками групи ЕАЕ.

За результатами комп'ютерного прогнозування у комбінації «метилпреднізолон-мелоксикам» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Суміжний фармакологічний спектр метилпреднізолону і мелоксикаму припускає підвищений ризик розвитку побічних ефектів, пов'язаних з гіперпригніченням біосинтезу простагландинів і біосинтезу циклооксигеназ (виразки шлунково-кишкового тракту), однак синергізм їх дії дозволяє зменшувати дози інгредієнтів, що входять до комбінації препаратів.

Аналізом електронно-мікроскопічних досліджень виявлена компенсаторна дія мелоксикаму на тлі лікування метилпреднізолоном експериментального алергічного енцефаломієліту як на стан нейронів кори і

гіпокампу головного мозку, так і на стан мікросудин головного мозку щурів в експериментальних умовах.

На підставі отриманих результатів дисертант приходить до висновку, що за умов демієлінізуючої патології (ЕАЕ) на фоні базової гормонотерапії, для медикаментозної корекції больового синдрому доцільно рекомендувати мелоксикам, який виявляв високий рівень болетамуючої дії та достовірно значимо знижував активність РGH-синтази в головному та спинному мозку.

У розділі 4 дисертантом представлений порівняльний аналіз знеболюючого потенціалу антиконвульсантів (карбамазепіну, топірамату, натрію вальпроату, габапентину та прегабаліну) у тварин за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

Встановлено, що анальгетична активність досліджених засобів була статистично значимо вищою у порівнянні з показниками щурів контрольної групи. Так, максимальна знеболююча дія спостерігалась на фоні введення прегабаліну та габапентину, що відповідало збільшенню антиноцицептивного потенціалу у 4,1 ($p \leq 0,05$) та 3,6 ($p \leq 0,05$) рази у порівнянні з показниками вихідного стану. Також продемонстровано, що на фоні введення натрію вальпроату та топірамату знеболюючий потенціал засобів на 90 хвилині складав лише 163,8% ($p \leq 0,05$) та 181% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками вихідного стану.

Зазначено, що за умов ЕАЕ антиконвульсанти не здатні повністю усувати дефіцит рухової активності, але нормалізують дослідницьку діяльність у щурів в тесті «відкрите поле». Найбільш виражений вплив антиконвульсантів щодо нормалізації поведінкових реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігався на фоні введення габапентину та прегабаліну.

Крім того, комбіноване введення М з антиконвульсантами за умов модельованої патології (ЕАЕ) в різному ступені сприяло зниженню рівня ліпопероксидації та посилювало активність системи антиоксидантного захисту. Найбільш виражений вплив антиконвульсантів щодо нормалізації показників вільнорадикального окислення та АОЗ, порушених індукцією ЕАЕ, також спостерігався на фоні введення габапентину та прегабаліну.

Встановлено, що курсове застосування карбамазепіну, топірамату, натрію вальпроату, габапентину і прегабаліну за умов експериментального ЕАЕ-індукованого невропатичного больового синдрому в різному ступені вираженості викликає відновлення порогів тактильної та больової чутливості, створюючи сприятливі умови для адекватного проведення імпульсу.

Так, здатність зменшувати вираженість тактильної алодинії зменшувалась у ряду габапентин (79%, $p < 0,05$) $\geq$ прегабалін (70%, $p < 0,05$) $>$ натрію вальпроат (42%, $p > 0,05$) $\geq$ топірамат (37%, $p > 0,05$) $>$ карбамазепін (23%, $p > 0,05$). Кількість відповідей ранньої і пізньої фази під впливом габапентину і прегабаліну у формаліновому тесті статистично значимо зменшувалася на 46% ($p < 0,05$) і 43% ($p < 0,05$) відповідно порівняно з показниками тварин контрольної групи. При цьому ослаблення хімічної гіпералгезії після введення карбамазепіну (18%, $p > 0,05$), топіпамату (29%, p

$> 0,05$) і натрію вальпроату (24%, $p > 0,05$), носило характер помірної тенденції. Крім того, продемонстровано, що за умов курсового введення карбамазепіну, топірамату, натрію вальпроату, габапентину та прегабаліну реєструвалося статистично значиме збільшення латентного періоду реакції облизування лапок в середньому на 52% ($p < 0,05$) по відношенню до показників контролю.

Максимальна вираженість терапевтичного ефекту габапентину і прегабаліну пояснюється, ймовірно, їх здатністю зв'язуватися з субодиницею $\alpha 2\delta$ (альфа-2-дельта) вольтажзалежних кальцієвих N-каналів, розташованих в поверхневій пластинці заднього рогу спинного мозку, які беруть участь у формуванні невропатичного болю. До того ж, антиноцицептивні ефекти зазначених препаратів можуть обумовлюватися гальмуванням вивільнення збуджуючих амінокислот з пресинаптичних закінчень, оскільки при більшості клінічних форм невропатичного болю канали NMDA-рецепторів повністю відкриті, що сприяє кальцієвому інфлюксу, підвищенню неврональної збудливості та генної експресії, внаслідок чого розвивається неврональна сенситизація, алодинія і гіпералгезія.

За результатами комп'ютерного прогнозування у комбінації «метилпреднізолон-мелоксикам» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Наголошується, що комбіноване застосування метилпреднізолону і габапентину може призводити до зменшення терапевтичної дії останнього внаслідок підвищення порога судомної готовності мозку метилпреднізолоном.

Аналізом електронно-мікроскопічних досліджень виявлене суттєве ослаблення перивенулярного набряку, характерного для змін в групі експериментального алергійного енцефаломієліту, що підтверджує позитивну дію габапентину на стан мікросудин головного мозку при експериментальному алергічному енцефаломієліті.

На підставі отриманих результатів дисертант приходить до висновку, що для корекції як хронічного так і невропатичного больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном доцільно рекомендувати ад'ювантні анальгетики, зокрема, антиконвульсанти габапентин та прегабалін, які виявляють виражену знеболюючу активність за умов модельованої патології.

У розділі 5 дисертантом представлені дослідження нейротропних ефектів антидепресантів (антидепресивна активність та здатність потенціювати медикаментозний сон), їх впливу на больову і тактильну чутливість, поведінкові реакції (рухово-дослідницька активність в тесті «відкрите поле» та м'язова сила) за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

Дисертантом встановлено, що на 90 хвилині тестування порогу больової чутливості максимальна знеболююча активність спостерігалась на фоні введення флуоксетину та тразодону, що відповідало збільшенню анальгетичного потенціалу у 2,7 ($p \leq 0,05$) та 3,1 ($p \leq 0,05$) рази у порівнянні з

показниками вихідного стану. При цьому на тлі застосування амітриптиліну знеболююча активність на 90 хвилині складала лише 166,2% ($p \leq 0,05$) щодо показників вихідного стану.

Дисертантом доведено, що дослідні антидепресанти проявляли достатній рівень протитривожної та антидепресивної дії у щурів з модельованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном. При цьому найменші показники іммобілізації при примусовому плаванні зареєстровані на фоні введення тразодону ($\downarrow$ у 1,7 рази) та пароксетину ($\downarrow$ у 1,6 рази) у порівнянні з показниками групи метилпреднізолону.

Встановлено, що при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки після курсового введення антидепресантів здатність зменшувати вираженість тактильної алодинії зменшувалась у ряду амітриптилін (60%, $p < 0,05$) > тразодон (40%, $p < 0,05$) >> флуоксетин (18%, $p > 0,05$) $\approx$ пароксетин (14%, $p > 0,05$). Показано, що після курсового введення антидепресантів кількість відповідей ранньої і пізньої фази під впливом амітриптиліну статистично значимо зменшувалася на 41% ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин контрольної групи. При цьому ослаблення хімічної гіпералгезії після введення тразодону (21%, $p > 0,05$), носило лише характер тенденції, а застосування флуоксетину і пароксетину практично не впливало на вивільнення медіаторів болю та запалення.

Відомо, що одним з напрямків терапії невропатичних больових синдромів є застосування психотропних препаратів, модулюючих опіоїдні і моноамінергічні нейромедіаторні системи. Антидепресанти вважаються препаратами першої черги для лікування такого болю. І хоча їх клінічне застосування супроводжується розвитком ряду побічних ефектів, амітриптилін і нортриптилін мають найбільшу доказову базу при терапії невропатичних больових синдромів: доведена дозозалежна болезаспокійлива дія саме трициклічних антидепресантів щодо алодинії, пекучого і стріляючого болю при РС. Селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну (флуоксетин, пароксетин), незважаючи на менш виражені побічні ефекти, не знайшли широкого застосування через недостатній антиноцицептивний потенціал, а клінічні спостереження за такими антидепресантами, як тразодон, нефазодон і міртазапін свідчать про їх ефективність у терапії невропатичного больового синдрому.

Вважається, що антиноцицептивні властивості антидепресантів більш виражені у препаратів, що впливають на як серотонінергічну, так і норадренергічну нейромедіаторні системи, що підтверджують результати дослідження, виконаного автором.

У розділі 6 дисертант представляє аналіз впливу ряду засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на неврологічний статус, умовно-рефлекторну активність, поведінкові реакції щурів, процеси енергозабезпечення і функціональний стан мітохондрій нейронів кори головного мозку та гістоморфометричні показники його утворень за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу.

Дисертантом встановлено, що застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ. Найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном є цитиколін, який найбільш ефективно попереджав розвиток неврологічних порушень і статистично достовірно, в 3,3 - 4 рази ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю зменшував тяжкість і тривалість перебігу експериментального еквіваленту розсіяного склерозу у тварин.

Показано, що курсове застосування засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу у щурів з ЕАЕ сприяло достовірно значимому збільшенню часу пасивно-оборонного рефлексу на 12 і 20 добу дослідження. Найбільш виражений вплив чинили цитиколін, α -ліпоева кислота і ніцерголін, які статистично достовірно збільшували тривалість ЛП₂ і ЛП₃ в порівнянні з групою активного контролю, що свідчило про позитивний вплив цих лікарських засобів на процеси введення інформації і здатність попереджати прискорене згасання набутого умовного навику в умовах експериментальної патології. Зокрема, цитиколін (500 мг/кг) сприяв збільшенню латентного періоду, на 49% ($p < 0,05$) і 63% ($p < 0,05$) перевершуючи даний показник групи активного контролю на 12 і 20 добу тестування пасивно-оборонного навику відповідно. Антиамнестична активність препарату характеризувалася зростанням показника K_{Aa} , який становив 84% і 95% відповідно на 12 і 20 добу експерименту. При цьому відсоток тварин з придбаним або збереженим навиком на 55% ($p = 0,06$) і 30% ($p = 0,06$) перевищував значення групи активного контролю у відповідні проміжки часу, що підтверджувало високий ноотропний потенціал цитиколіну у щурів з ЕАЕ. Слід зазначити, що препарат зменшував недолік просторової пам'яті: під впливом цитиколіну значення $K_{Пв}$ у тварин з втраченою навичкою в умовах експериментальної демієлінізуючої патології ЦНС достовірно збільшувалося в 5 разів ($p < 0,05$).

Встановлено, що експериментальний алергічний енцефаломієліт викликав гальмування малат-аспартатного шунта, що виражалось в зменшенні рівня малату на 51% ($p < 0,05$) і аспартату на 40% ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин.

Подібні зміни, ймовірно, були наслідками вторинної мітохондріальної дисфункції. Як свідчать результати експерименту, комбіноване сумісне введення метилпреднізолону і цитиколіну викликало достовірно значимий вплив на деякі показники дисфункції мітохондрій і енергетичного обміну головного мозку. Зокрема, введення вказаної комбінації призводило до достовірного зниження швидкості відкриття мітохондріальної пори на 66 % ($p < 0,05$) і підвищенню заряду внутрішньої мембрани мітохондрії на 69% ($p < 0,05$).

Доведено, що внаслідок нормалізації функціональної активності мітохондрій головного мозку тварин з ЕАЕ під дією комбінації метилпреднізолону і цитиколіну відбувалося достовірне підвищення рівнів

АТФ на 15% ($p < 0,05$) і АДФ на 16% ($p < 0,05$), а також зниження лактату на 27% ($p < 0,05$) і підвищення пірувату та ізоцитрату на 35% ($p < 0,05$) і 81% ($p < 0,05$) відповідно.

Встановлено, що модельована патологія призводила до пошкодження нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку експериментальних тварин. Зокрема, в групі щурів з ЕАЕ спостерігалось зменшення щільності нейроцитів на 19% ($p < 0,05$), що свідчило про загибель клітин, і підвищення їх площі на 10%, що підтверджувало розвиток їх набряку. Крім того, за умов ЕАЕ було зареєстроване зниження транскрипційних процесів в нейронах сенсомоторної кори, про що свідчило зниження рівня РНК на 21%.

Доведено, що призначення тваринам з ЕАЕ комбінованої терапії метилпреднізолоном і цитиколіном підвищувало ефективність нейропротекції. Зокрема, у щурів з експериментальною патологією, які отримували комбінацію метилпреднізолону і цитиколіну, щільність нейронів підвищилася на 9,4% ($p < 0,05$), а їх площа досягла значень інтактних тварин; при цьому концентрація РНК зросла на 8,7%. До того ж, за даних умов експерименту щільність апоптичних та деструктивних клітин зменшилася на 19,5% ($p < 0,05$), а частка апоптичних нейронів знизилася на 42%. Дисертант приходить до висновку, що посилення нейропротективного ефекту спільного введення метилпреднізолону з цитиколіном можна пояснити через призму NO-залежних механізмів нейроапоптозу та мітохондріальної дисфункції. Ймовірно, ефекти цитиколіну і метилпреднізолону при ЕАЕ направлені на спільне пригнічення експресії і активності iNOS.

Аналізом електронно-мікроскопічних досліджень доведено, що експериментальна нейропротективна терапія цитиколіном на фоні базової гормонотерапії у щурів з ЕАЕ сприяє нормалізації морфо-функціонального стану нейронів, глії і синаптичного апарату в гіпокампі і корі великих півкуль, активації процесів адаптації у цих утвореннях і попередженню ушкодження нейроцитів та їх апоптозу за умов експериментального еквівалента демієлінізуючої патології ЦНС.

За результатами комп'ютерного прогнозування у комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» автор наголошує, що, виходячи з відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямою (опосередковано через метаболічні процеси) механізми розвитку терапевтичного ефекту розглянутих сполук, з фармакокінетичної точки зору комбінація метилпреднізолону з цитиколіном є безпечною та ефективною.

Розділ 7. «Аналіз та узагальнення отриманих даних» підтверджує глибину знань дисертанта по даному науковому напрямку і вміння аналізувати і оцінювати отримані результати з урахуванням даних літератури.

Ознайомлення з цим розділом створює враження цілісності виконаної роботи, а її автор володіє знанням сучасної наукової літератури, грамотно аналізує і описує отримані результати. Стиль викладу власних результатів досліджень чіткий, що дозволило дисертанту систематизувати отриманий

матеріал і зробити науково обґрунтовані висновки, які відповідають поставленій меті та завданням дисертаційної роботи.

Список використаних джерел складений у відповідності з існуючими вимогами, з чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань. 72% наведених публікацій датовано за останні 10 років.

Наукова новизна одержаних результатів

В експерименті вперше проведені системні порівняльні дослідження антиноцицептивного потенціалу класичних ненаркотичних (парацетамол, диклофенак натрію, ібупрофен, лорноксикам, мелоксикам, целекоксиб, кеторолак) і ад'ювантних (карбамазепін, топірамат, вальпроат натрію, габапентин, прегабалін, амітриптилін, флуоксетин, пароксетин, тразодон) анальгетиків, а також нейропротекторної активності цитиколіну, альфа-ліпоєвої кислоти, ніцерголіну, донепезилу і фіксованої комбінації «В»-вітамінного комплексу нейровітану за умов модельованої демієлінізуючої патології – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ). Доведене ключове значення активності РGH-синтази головного та спинного мозку в механізмах знеболюючої дії досліджуваних нестероїдних протизапальних засобів та вперше проведений кореляційний аналіз між рівнем зазначеного фермента і антиноцицептивним потенціалом НПЗЗ. Теоретично обґрунтовані механізми нейропротекторної та ноотропної активності цитиколіну, альфа-ліпоєвої кислоти, ніцерголіну, донепезилу і нейровітану та доцільність їх призначення для терапії та профілактики порушень когнітивних функцій, індукованих ЕАЕ. Вперше проведений системний поглиблений аналіз мітопротекторної активності в механізмах нейропротекції комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту та доведена доцільність їх сумісного застосування як на фізико-хімічному рівні, так і на рівні фармакокінетичних взаємодій.

Встановлено, що застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ. Показано, що найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном є цитиколін, який найбільш ефективно попереджає розвиток неврологічних порушень і статистично достовірно, в 3,3 - 4 рази ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю зменшує тяжкість і тривалість перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту у тварин. Зазначено, що курсова нейропротективна терапія не забезпечує повного відновлення ультраструктурних змін мозку, проте збільшує щільність упаковки синаптичних везикул і сприяє стабілізації структури пресинаптичної та постсинаптичної мембран, активує компенсаторно-адаптаційні процеси в нейрональних і гліальних клітинах, а також стабілізує стан гематомікроциркуляторного русла.

Доведено, що в комбінаціях «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі), так і на рівні фармакокінетичних взаємодій. З урахуванням відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямого механізму розвитку терапевтичного ефекту досліджених сполук з фармакокінетичної точки зору найбільш доцільною є комбінація метилпреднізолону з цитиколіном.

Експериментально обґрунтовано, що застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту є ефективним та раціональним напрямком фармакотерапії больового синдрому, а призначення композиції «метилпреднізолон-цитиколін», що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієліну і кардіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект, представляється перспективним напрямком нейропротективної терапії ЕАЕ.

Наукова новизна підтверджена Патентом України на корисну модель №111354 та інформаційними листами (вип. 2 та вип. 8, 2015 р.).

Практичне значення одержаних результатів

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в поглибленні уявлень про фармакодинамічні особливості класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні базової гормонотерапії.

На підставі фармакологічних досліджень доведена висока ноотропна та нейропротективна активність фармацевтичної комбінації цитиколіну та метилпреднізолону. Експериментально обґрунтована доцільність комбінованої терапії больових синдромів з використанням неопіїдних анальгетиків, антидепресантів та антиконвульсантів із базовою фармакотерапією розсіяного склерозу з метою підвищення ефективності антиноцицептивної терапії у хворих на розсіяний склероз.

За результатами дисертаційної роботи оформлено інформаційні листи з проблеми «Фармакологія» (вип. 2, 2015 р.; вип. 8, 2015р.), Патент України на корисну модель №111354.

Результати проведених досліджень впроваджено в науково-педагогічну діяльність кафедр фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Запорізького державного медичного університету, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет», Одеського національного медичного університету, Національного медичного

університету ім. О.О. Богомольця, ЗО «Гродненський державний медичний університет» республіки Беларусь.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота Нефьодова Олександра Олександровича «Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту» базується на достатньому обсязі даних експериментальних досліджень. Використані в роботі методи є адекватними поставленим завданням. Кількість проведених досліджень є достатнім для достовірної аргументації основних положень і висновків дисертаційної роботи.

Ефективність досліджуваних об'єктів оцінювалася шляхом реєстрації найбільш інформативних тестів у порівнянні з референтними препаратами на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту.

Фактичний матеріал достатньо повно ілюстрований таблицями та рисунками. Всі теоретичні узагальнення та висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і повністю віддзеркалюють закономірності, що виявлені у ході проведених експериментів.

Зазначене дозволило обґрунтувати наукові положення, висновки, сформульовані в дисертації, і довести наукову новизну роботи.

Результати дисертації цілком переконливі, їх достовірність не викликає сумнівів.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих роботах і в авторефераті

За темою дисертації опубліковано 57 робіт, у тому числі 30 статей у фахових наукових виданнях, 1 монографія, 1 патент на корисну модель, 2 інформаційних листи, 1 авторське свідоцтво, 22 тези доповідей у матеріалах конгресів, з'їздів, науково-практичних конференцій та симпозіумів.

Зауваження, що стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату

1. У розділі «Матеріали і методи» відсутній підрозділ, який схематично або текстово відображав би дизайн дослідження.
2. Не вказані режими введення препаратів, які отримували тварини кожної експериментальної групи окремо
3. В дослідженнях не використовували специфічних маркерів нейродегенерації - ICAM-1 - Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1, білки щільних контактів, AChR-антитіла до рецепторів ацетилхоліну, простагландин Д синтаза ліпокалінового типу, що дозволило б більш об'єктивно оцінити ефективність виробленої стратегії нейропротекції при розсіяному склерозі
4. Не проведено статистичний аналіз таких важливих показників проведеної нейропротекції, як індекс нейродегенерації у тварин різних груп за методом Каплана-Мейера з розрахунком кумулятивного критерію виживання.

5. Не вказані особливості підготовки тварин, забору і зберігання біологічного матеріалу при проведенні біохімічних, імуноферментних, імуногістохімічних та морфологічних досліджень
6. Не зазначено, яку фракцію гомогенату мозку (цитозольну або мітохондріальну) використовували при проведенні біохімічного аналізу і як її виділяли.
7. На жаль в тесті відкрите поле не досліджені такі показники як відсоток активності і неактивності, кількість замираний і входжень в центр, відстань, пройдено біля стінки і в центральній області арили, вертикальну пошукову активність (кількість стійок на задніх лапах біля стінки і в центрі), кількість подій короткого і довгого грумінга, кількість актів дефекації і урінації, які дозволили б виявити порушення мнестичних функцій ЦНС і емоційної сфери експериментальних тварин.
8. Не проведено розрахунок і експериментально не доведено оптимальне співвідношення цитиколіну і метилпреднізолону в лікарській комбінації з використанням адитивної моделі або методу кривих «непаралельних доз-реакц

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Поясніть роль мітохондріальної дисфункції в прогресуванні нейродегенерації при розсіяному склерозі. Які ланки-мішені найбільш перспективні в цьому відношенні для нейропротекції з урахуванням арсеналу сучасних засобів.
2. Вами отримані дані про формування стійкого енергетичного дефіциту нейронів головного мозку при експериментальному алергічному енцефаломієліті. Які специфічні механізми цього явища при даній патології. Як Ви вважаєте чи буде терапевтично виправданим додаткове введення засобів метаболітотропної корекції енергетичного обміну.
3. Відомо, що важливим механізмом нейродегенерації при розсіяному склерозі є NO-залежний, що активується при порушеннях нітроксидергічної системи (підвищення експресії nNOS, iNOS, гіперпродукція цитотоксичних форм монооксиду азоту). Чи можливо антиапоптотичне дію комбінації цитиколіну і метилпреднізолону розглянути через призму впливу на нітроксидергічну систему. На які ланки цієї системи можливо спільне, взаємно посилюючий вплив цитиколіну і метилпреднізолону.
4. Як Ви вважаєте наскільки фармакологічне придушення Th1-цитокинового механізму нейродегенерації є обгрунтованою в лікуванні розсіяного склероза. Яка перспектива селективних блокаторів IL-1b рецепторів. Чи можлива фармакологічна (антиоксидантна або нейрометаболічна) модуляція цитокинової нейропротекції

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.

ВИСНОВКИ

У дисертації Нефьодова Олександра Олександровича «Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту» наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання, яке полягає у експериментально-теоретичному обґрунтуванні раціонального і безпечного використання класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні базової гормонотерапії.

Дисертація Нефьодова Олександра Олександровича є завершеним науковим дослідженням і містить нові, раніше незахищені науково обґрунтовані положення з фармакології, що зазначені вище.

Враховуючи актуальність теми, наукову новизну, практичну значимість, а також обсяг і методичний рівень досліджень, дисертаційна робота Нефьодова Олександра Олександровича «Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту» за фахом 14.03.05 - фармакологія відповідає вимогам п.10 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., а дисертант заслуговує присудження йому наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія.

Завідувач кафедри фармакології
та медичної рецептури
Запорізького державного медичного
університету, професор



Власноручний підпис І.Ф. Беленічев
ПІДТВЕРДЖУЮ
Нач. відділу кадрів Запорізького
державного медичного університету
_____ 20 ____ р. Підпис _____