

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
«ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ»
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

НЕФЬОДОВ Олександр Олександрович

Гриф

Прим. № _____

УДК 616.832-004-092.9:615.212.3:615.279:615.07

ДИСЕРТАЦІЯ

**ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ
НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ**

14.03.05 – фармакологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ **О.О. Нефьодов**

Науковий консультант: **Мамчур Віталій Йосипович,**
доктор медичних наук, професор

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (виконання роботи), Дніпро; ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (захист), Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному розв'язанню проблеми пошуку шляхів раціонального адекватного медикаментозного знеболення та терапії когнітивних і нейродегенеративних розладів за умов модельованого еквівалента розсіяного склерозу.

Розсіяний склероз є прогресуючим аутоімунним захворюванням ЦНС, при якому інфільтрація тканин мозку Т-клітинами, що проходять через гематоенцефалічний бар'єр, є ключовим моментом у появі характерного запалення і розвитку демієлінізації. Вважають, що цей процес може ініціюватися попаданням вірусних або бактеріальних факторів в нервову тканину і появою їх білків на мембранах олігодендроцитів і мієлінових оболонках. Подальша аутоімунна відповідь спрямована проти мієлінових антигенів, що призводить до порушень в системі розпізнавання останніх. Т-клітини вже в присутності місцевих аутоантигенів провокують розвиток розсіяних периваскулярних вогнищ запалення в ЦНС. Периваскулярна інфільтрація запальних клітин в ЦНС опосередковується їх адгезією до ендотеліальних клітин і подальшою міграцією через гематоенцефалічний бар'єр. Синтезовані Т-клітинами прозапальні цитокіни (інтерлейкін 2, лімфотоксин, γ -інтерферон, фактор некрозу пухлин - TNF- α) сприяють тривалому посиленню проникності гематоенцефалічного бар'єру. Крім того, цитокіни запускають процеси активації клітин мікроглії, макрофагів і астроцитів. У відповідь мікрогліальні клітини секретують запальні цитокіни і

підвищену кількість вільних радикалів, що сприяє некрозу клітин, лізису мембран і інтенсивному пошкодженню мієліну і олігодендроцитів.

З урахуванням зазначеного, для підвищення ефективності терапії розсіяного склерозу були досліджені компоненти нейропротективно-антиоксидантного комплексу, які сприяли гальмуванню прогресування РС, уповільненню швидкості апоптозу нейронів і олігодендроцитів, а також зменшенню інтенсивності пошкодження мієліну вільними радикалами, антитілами і запальними цитокінами.

Як зазначається рядом авторів, розвиток психоневрологічної патології, зокрема, РС, досить часто супроводжується проявом алгічних синдромів різної тривалості та інтенсивності. Традиційно для усунення або ж ослаблення проявів больового синдрому малої та середньої вираженості застосовують неопіїдні анальгетики та засоби ад'ювантної терапії. Саме тому при наявності у хворих на РС супутнього больового синдрому набуває актуальності питання щодо раціонального та адекватного знеболення з урахуванням базової гормонотерапії.

Для проведення досліджень використана модель експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) як найбільш адекватна модель відтворення розсіяного склерозу на лабораторних тваринах. ЕАЕ, відтворюваний шляхом внутрішньошкірного введення гомогената головного, спинного мозку і периферичних нервів зі стимулятором Фрейнда, відноситься до істинного аутоімунного захворювання нервової системи. Клінічна картина цих захворювань характеризується порушенням координації рухів, розладом функції тазових органів, розвитком парезів і паралічів задніх кінцівок, кахексією та ін. Природно, що експериментальний алергічний енцефаломієліт представляє лише відносну, наближену модель демієлінізуючих захворювань людини, так як між демієлінізуючими захворюваннями в клініці та експерименті є істотна відмінність в характері клінічного перебігу, а також гістологічних ушкоджень мозкової тканини. Проте клінічні, біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при

експериментальному алергічному енцефаломієліті мають принципову схожість з аналогічними змінами при демієлінізуючих захворюваннях людини. Це дає підставу розглядати їх як достатньою мірою адекватну модель, що дозволяє досить значно розширити межі досліджень питань етіології, патогенезу, клініки, терапії та профілактики демієлінізуючих захворювань.

Аналізом спектру антиноцицептивної активності досліджених неопіїдних анальгетиків показано, що за умов демієлінізуючої патології (ЕАЕ) на фоні базової гормонотерапії для медикаментозної корекції соматичного больового синдрому доцільно рекомендувати мелоксикам, який виявляв високий рівень болетамуючої дії та достовірно значимо знижував активність PGH-синтази в головному та спинному мозку.

Встановлено, що для корекції як хронічного, так і невропатичного больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном доцільно рекомендувати ад'ювантні анальгетики, насамперед, антиконвульсанти габапентин та прегабалін, які виявляють виражену знеболюючу активність за умов модельованої патології. Як свідчать результати, отримані нами, після курсового введення протисудомних засобів або ж антидепресантів при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки реєструвалося підвищення порогу тактильної чутливості. 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%, $p > 0,05$). При цьому статистично значиме підвищення порогу алодинії по відношенню до показників активного контролю під впливом антидепресантів реєструвалося тільки у тварин, яким вводили амітриптилін і тразодон (-60%, $p < 0,05$ і -40%, $p < 0,05$ відповідно).

Показано, що застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість

тварин з важким перебігом ЕАЕ. Найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном виявився 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.

Підтвердженням нейропротективного ефекту сумісного введення метилпреднізолону з цитиколіном є результати аналізу їх впливу на гістоморфометричні показники нейронів кори головного мозку та ультраструктурну організацію неокортексу та гіпокампа у тварин з ЕАЕ. Визначено, що цитиколін покращує морфо-функціональний стан нейронів, глії і синаптичного апарату у цих мозкових утвореннях, що сприяє активації механізмів адаптації і запобігає процесам ушкодження нейроцитів та їх подальшому апоптозу. 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% ($p < 0,05$). При цьому ультрамікроскопічні дослідження кори фронтальної долі та гіпокампа головного мозку щурів при введенні метилпреднізолону та цитиколіну за умов ЕАЕ продемонстрували зниження ступеню набряку цитоплазми олігодендроцитів; зменшення обсягу патологічних змін в мітохондріях; відновлення електронної щільності цитоплазми та кількості рибосом до норми; нормалізацію структурної організації ядер нейронів, які можуть розцінюватись як маркери компенсаторної дії цитиколіну на нейрони за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу.

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. Суміжний фармакологічний спектр метилпреднізолону і мелоксикаму припускає підвищений ризик розвитку побічних ефектів, пов'язаних з гіперпригніченням біосинтезу простагландинів і біосинтезу циклооксигеназ, однак синергізм їх дії дозволяє зменшувати дози інгредієнтів, що входять до комбінації препаратів. Крім того, від спільного застосування метилпреднізолону з цитиколіном слід очікувати посилення його стимулюючої дії. Виходячи з відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямою (опосередковано через метаболічні процеси) механізмі розвитку терапевтичного ефекту розглянутих сполук, з фармакокінетичної точки зору комбінація метилпреднізолону з цитиколіном є безпечною та ефективною.

Експериментальний алергічний енцефаломієліт викликає ультраструктурні зміни нейронального, гліального і синаптичного апарата, які є основою деструкції нейронів і подальшої ініціалізації процесів їх апоптозу в неокортексі і гіпокампі експериментальних тварин. Курсова нейропротективна терапія не забезпечує повного відновлення патологічних змін ультраструктурних 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.

Фармакологічний аналіз антиноцицептивної та нейропротективної активності комбінованого застосування класичних та ад'ювантних знеболюючих засобів і засобів медикаментозного захисту мозку з метилпреднізолоном як препаратом базової гормонотерапії за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу дозволив визначити ефективні та раціональні напрямки фармакотерапії больового синдрому шляхом застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин», які сприяють збереженню достатнього

антиноцицептивного потенціалу мелоксикаму та габапентину, а також встановити стратегічний напрямок нейропротективної терапії ЕАЕ завдяки композиції «метилпреднізолон-цитиколін», що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієлану і карбіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект.

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

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в поглибленні уявлень про особливості фармакодинаміки та фармакокінетики класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов модельованого еквіваленту розсіяного склерозу 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.

Ключові слова: розсіяний склероз, експериментальний алергічний енцефаломієліт, неопіїдні анальгетики, знеболення, демієлінізація, нейропротектори, ад'ювантна терапія.

ANNOTATION

Nefedov O.O. Pharmacological analysis of neuroprotection in conditions of experimental allergic encephalomyelitis. - Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for scientific degree of doctor of medical sciences in a specialty 14.03.05 – pharmacology. – SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health

Ministry of Ukraine» (Implementation of the thesis), Dnipro; SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine» (defense), Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to solving experimental problems finding adequate ways of rational drug pain relief and treatment of cognitive disorders and neurodegenerative conditions simulated by the equivalent of multiple sclerosis.

Multiple sclerosis (MS) is a progressive autoimmune disease of the central nervous system (CNS) in which brain tissue infiltration of T cells that pass through the blood-brain barrier is a key factor in the appearance of the characteristic inflammation and demyelination. It is believed that this process may be triggered by viral or bacterial hit factors in nervous tissue and the appearance of proteins on the membranes and myelin oligodendrocyte membranes. Further autoimmune response targeted against myelin antigens, leading to disturbances in the system of recognition of them. T cells are in the presence of local autoantigens provoke the development of scattered foci of perivascular inflammation in the CNS. Perivascular infiltration of inflammatory cells into the CNS is mediated by their adhesion to endothelial cells and the subsequent migration of the blood-brain barrier. Synthesized T cells proinflammatory cytokines (interleukin 2, limfotoksyn, γ -interferon, tumor necrosis factor - TNF- α) contribute to strengthening long-term permeability of the blood-brain barrier. In addition, cytokines trigger activate processes of microglia cells, macrophages and astrocytes. In response microglial cells secrete inflammatory cytokines and increased the number of free radicals that promotes cell death, lysis of membranes and heavy damage to the myelin and oligodendrocyte.

In view of the above, to improve the treatment of multiple sclerosis were investigated components of neuroprotective- antioxidant complex that contributed to the deceleration in the progression of MS, slowing down the rate of apoptosis of neurons and oligodendrocyte and myelin damage to reduce the intensity of free radicals, inflammatory cytokines and antibodies. As noted by several authors, the development of neuropsychiatric diseases, including MS, often accompanied

illogical manifestation of syndromes of different duration and intensity. Traditionally, the removal or easing of pain manifestations of low and medium severity nonopioid analgesics and adjuvant agents used. Therefore, in patients with MS concomitant pain gets urgency the issue of rational and adequate anesthesia given basic hormone. For the study used a model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) as the most adequate model of multiple sclerosis of reproduction in laboratory animals. EAE, reproduced by intradermal administration of homogenate of the brain, spinal cord and peripheral nerve stimulator with Freund refers to a true autoimmune disease of the nervous system. The clinical picture of the disease characterized by impaired motor coordination, disorders of pelvic organs, the development of paresis and paralysis of hind limbs, cachexia and others. Naturally, that experimental allergic encephalomyelitis represents only relative, approximate model of demyelinating diseases of humans, as between demyelinating diseases in clinic and experiment is a significant difference in the nature of the clinical course and histologic damage of the brain tissue. However, the clinical, biochemical, immunological and morphological changes in experimental allergic encephalomyelitis have fundamental similarities with similar changes in the human demyelinating diseases. This allows us to consider them as sufficiently adequate model that allows one to expand the boundaries of research on the etiology, pathogenesis, clinical manifestations, treatment and prevention of demyelinating diseases.

Analysis of the spectrum of antinociceptive activity studied nonopioid analgesics shown that under conditions of demyelinating disease (EAE) against the background of basic hormone for pharmacological therapy of somatic pain appropriate to recommend meloxicam, which showed a high level of analgesic action and fairly significantly reduced the activity of PGH-synthase in the brain and spinal cord.

Found that to correct a chronic and neuropathic pain on the background of basic drug therapy of methylprednisolone appropriate to recommend adjuvant analgesics, especially anticonvulsants gabapentin and pregabalin, which exhibit a

pronounced analgesic activity under conditions of simulated disease. According to the results obtained by us after a course of introduction of anticonvulsants or antidepressants during mechanical stimulation of the hind limb was registered increase of threshold of the tactile sensitivity. The ability to reduce an expression of tactile allodyni decreased in a group of gabapentin (-79%, $p < 0.05$) $\geq$ pregabalin (-70%, $p < 0.05$) $>$ sodium valproate (-42%, $p > 0.05$) $\geq$ topiramate (-37%, $p > 0.05$) $>$ carbamazepine (-23%, $p > 0.05$). However statistically significant increase of threshold of allodyni relative to that of the active control under the influence of antidepressants was recorded only in animals injected amitriptyline and trazodone (-60%, $p < 0.05$ and 40%, $p < 0.05$, respectively).

It is shown that the use of drugs with neuroprotective-antioxidant complex able to prevent deaths, hinder the development of neurological disorders or reduce the number of animals with severe EAE. The best means of neuroprotection during EAE in conditions of methylprednisolone therapy was citicoline, which is most effectively warned the development of neurological disorders and significantly, by 3.3 - 4 times ($p < 0.05$) compared with the control group, reduced the severity and duration of the pilot course equivalent multiple sclerosis in animals.

The confirmation of neuroprotective effect of co-administration of methylprednisolone with citicoline is an analysis of their impact on histomorphometrical indexes of neurons of the cerebral cortex and ultrastructural organization of the neocortex and hippocampus in animals with EAE. Determined that citicoline improves the morpho-functional state of neurons, glia and synaptic apparatus in these cerebral structures, which promotes of the activation mechanisms of adaptation and prevents processes of damage of neurocytes and their subsequent apoptosis. Specifically, in rats with experimental pathology treated with a combination of citicoline and methylprednisolone, the density of neurons increased by 9.4% ($p < 0.05$), and their area reached values of intact animals; the concentration of RNA increased by 8.7%. Moreover, under these experimental conditions the density of apoptotic and destructive cells decreased by 19.5% ($p < 0.05$), and the proportion of apoptotic neurons decreased by 42% (p

<0.05). However investigation of ultramicroscopic of frontal cortex and hippocampus of the brain of rats at introduction of methylprednisolone and citicoline under the conditions EAE showed reduce of the stage of swelling of cytoplasm of oligodendrocyte; reduction of pathological changes in the mitochondria; reduction of pathological changes in the mitochondria; recovery of the electron density of the cytoplasm and the number of ribosomes to normal; normalization of the structural organization of the nuclei of neurons that can be considered as markers of compensatory action of citicoline to neurons under the experimental equivalent of multiple sclerosis.

In combination "methylprednisolone-meloxicam", "methylprednisolone-gabapentin" and "methylprednisolone, citicoline" no possible interactions both on physical and chemical level (in a combination dosage form), and the level of pharmacokinetic interactions. An adjacent pharmacological spectrum of methylprednisolone and meloxicam involves an increased risk of adverse effects associated with hyperinhibition of biosynthesis of prostaglandins and cyclooxygenase biosynthesis, but synergies of their actions will reduce the dose of the ingredients that make up a combination of drugs. In addition, the joint use of methylprednisolone with citicoline should be expected strengthening its stimulating action. Based on the difference in half-life and indirectly (indirectly through metabolic processes) mechanism of the therapeutic effect of the compounds examined, with pharmacokinetic standpoint combination of methylprednisolone with citicoline is safe and effective.

Experimental allergic encephalomyelitis causes ultrastructural changes in neuronal, glial and synaptic apparatus, which are the basis of further destruction of neurons and initialization process of apoptosis in the cortex and hippocampus of experimental animals. Course neuroprotective therapy does not ensure full recovery ultrastructural pathological changes in the brain, but increases the packing density of synaptic vesicles and presynaptic helps stabilize the structure and postsynaptic membranes, activates compensatory and adaptive processes in neuronal and glial cells and stabilizes the condition of the blood microcirculation.

Pharmacological analysis of antinociceptive and neuroprotective activity of combined use of classic and adjuvant analgesics and medical protection means brain as with methylprednisolone as basic hormone under the experimental equivalent of MS allowed to define effective and rational pharmacotherapy of pain areas by applying combinations "methylprednisolone-meloxicam" and "methylprednisolone-gabapentin" which contributing to the maintenance of sufficient antinociceptive potential of gabapentin and meloxicam, and set the strategic direction of neuroprotective therapy EAE through a combination of "methylprednisolone, citicoline," which promotes biodegradation braking sfinhomiyelan karbiolipin and restores glutathione reductase activity by stimulating the synthesis of glutathione and detecting anti apoptotic effect.

Scientific innovation is confirmed by patents of Ukraine for utility model №111354, and newsletters (no. 2 and no. 8, 2015).

The practical significance of the thesis is deepening perceptions about the features of pharmacodynamics and pharmacokinetics of classic and adjuvant analgesics and medical protection means the brain under conditions of simulated equivalent of multiple sclerosis on the background of the basic hormone treatment.

Based on pharmacological studies proved the high neuroprotective activity and neuroprotective pharmaceutical combination of citicoline and methylprednisolone. Experimental expediency combined therapy of pain syndromes with the use of nonopioid analgesics, antidepressants and anticonvulsants with basic pharmacotherapy of MS to improve the efficiency antinociceptive therapy in patients with multiple sclerosis.

Keywords: multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, nonopioid analgesics, pain management, demyelination, neuroprotective, adjuvant therapy.

Список публікацій здобувача

1. Нефьодов О.О. Роль імунотерапії у хворих на розсіяний склероз в практиці сімейного лікаря / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, О.І. Корсунська, О.І. Кальбус // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.1 (113). – С. 25-30. *(Особистий внесок дисертанта: пошук наукової інформації, участь у її аналізі і узагальненні, формулювання висновків)*
2. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.2 (114). – С. 205-208. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
3. Нефьодов О.О. Вплив знеболюючих засобів на дослідно-орієнтовну функцію ЦНС у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. – 2014. - №4 (46). – С. 135-139.
4. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіоїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-111.
5. Нефьодов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
6. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции болевого синдрома при рассеянном склерозе (обзор литературы) / А.А. Нефедов // Буковинський медичний вісник. – 2015.- Т. 19, №1 (73). – С. 232-236.

7. Нефедов А.А. Опыт применения цитиколина в экспериментальной терапии моделированного аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.2, Т. 4 (121). – С. 165-170. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
8. Нефьодов О.О. Зміни аналгетичного потенціалу антиконвульсантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, Т. 1 (122). – С. 161-164. *(Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків і подальших перспектив, оформлення статті до друку)*
9. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №2. – С. 4-11. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження, участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків)*
10. Нефьодов О.О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій аналгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - №1(25). - С. 35-38. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
11. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGN-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу

- / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
12. Нефьодов О.О. Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №3 (44). – С. 10-16. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних джерел, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
13. Нефьодов О.О. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом у тесті «відкрите поле» / О.О. Нефьодов // Одеський медичний журнал. – 2015. - №5 (151). – С. 14-19.
14. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.
15. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)*
16. Нефьодов О.О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-9. *(Особистий внесок дисертанта:*

планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)

- 17.Нефьодов О.О. Зміни рухово-дослідницької поведінки тварин під впливом антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. - 2015. - №4(54). – С. 131-134.
- 18.Нефьодов О.О. Порівняльна характеристика болезаспокійливої активності протисудомних засобів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 2 (26). - С. 45-47.
(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)
- 19.Нефьодов О.О. Нейротропні ефекти антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №6 (46). – С. 28-33.
- 20.Nefedov A.A. Pharmacological Correction of Neurological Disorders in Case of Multiple Sclerosis / A.A. Nefedov, V.I. Mamchur // Galician Medical Journal. – 2015. – Vol. 22, N 4, part 2. – P. 39-41. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
- 21.Нефедов А.А. Оценка эффективности нейропротективной терапии экспериментального аллергического энцефаломиелита в условиях базовой терапии солу-медролом / А.А. Нефедов // Biomedical and Biosocial Antropology. – 2015. - №24. – С. 65-70.
- 22.Нефьодов О.О. Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому та демієлінізуючої патології / О.О. Нефьодов, В.Б. Ларіонов, М.Я.

- Головенко, В.Й. Мамчур // Журнал Національної академії медичних наук. – 2015. – Т.21, №3-4. – С. 398-403. (*Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка отриманих даних*)
23. Нефьодов О.О. Оцінка змін рухової та емоційної активності щурів під впливом антиконвульсантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2016. – №1(73). – С. 12-18.
24. Нефедов А.А. Оценка антиноцицептивного потенциала антидепрессантов в терапии невропатической боли, индуцированной экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Т.20, №1 (77). – С. 94-98. (*Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку*)
25. Нефедов А. Изучение влияния комбинированного использования метилпреднизолона с цитиколином на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его образований в условиях рассеянного склероза в эксперименте / А. Нефедов, В. Мамчур // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2016. - №1. - Р. 142-156. (*Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку*)
26. Нефедов А.А. Особенности ультраструктуры фронтальной коры и гиппокампа крыс в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, В.Й. Мамчур, И.В. Твердохлеб // Morphologia. – 2016. – Т.10, №1. – С. 54-61. (*Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження,*

участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків)

27. Nefedov Alexander A. Pharmacological Analysis of Neuroprotective Action of Methylprednisolone with Citicoline in Conditions of Experimental Allergic Encephalomyelitis / Alexander A. Nefedov, Vitaly I. Mamchur, Andrey V. Abramov, Nina V. Bukhtiyarova // Biological Markers and Guided Therapy. – 2016. – Vol.3, N1. – P. 115-124. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
28. Нефедов А.А. Применение цитиколина для коррекции ультраструктурных изменений ЦНС, индуцированных экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип.2, Т.2 (129). – С. 235-240. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення результатів експерименту, участь у розробці загальної концепції роботи)*
29. Нефедов А.А. Прогнозирование в экспериментах in silico взаимодействия габапентина с метилпреднизолоном как средств комбинированной терапии демиелинизирующих заболеваний / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур, В.Б. Ларионов, В.С. Смандич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. - №2 (48). – С. 67-73. *(Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
30. Нефедов О.О. Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу / О.О. Нефедов, В.Й. Мамчур, В.Б. Ларіонов, С.М. Дронов // Світ медицини та біології. - 2016. - №2(56). – С. 52-58. *(Особистий внесок дисертанта: статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*

- 31.Корсунська О.І. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О.І. Корсунська, О.О. Нефьодов. – Дніпропетровськ: «Літограф», 2015. – 203 с. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
- 32.Пат. 111354 Україна, МПК А 61 К 31/00, А 61 Р 25/00. Спосіб лікування розсіяного склерозу / Нефьодов О.О., Мамчур В.Й., Дронов С.М., Макаренко О.В.; заявник та патентовласник Нефьодов Олександр Олександрович, Мамчур Віталій Йосипович, Дронов Сергій Миколайович, Макаренко Ольга Володимирівна – № у 201604214 ; заявл. 18.04.16; опубл. 10.11.2016, Бюл. №21. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*
- 33.Нефьодов О.О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка до друку)*
- 34.Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормонональної терапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*
- 35.А. с. 60033 Україна. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О. І. Корсунська, О. О. Нефьодов (Україна). – Заявл. 08.04.2015 ; опубл. 05.06.2015.

- (Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
36. Nefedov A.A. The pain syndrome in multiple sclerosis / A.A. Nefedov // Матеріали науково-практичної конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації», 02-05 травня 2014 року. – Будапешт-Прага-Київ, - К.: КНЛУ, НДІР. – С. 178-179.
 37. Нефьодов О.О. Фармакотерапевтична корекція больових синдромів при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.», 30-31 травня 2014 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 102-104.
 38. Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз терапії болю за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали XV конгресу СФУЛТ, 16-18 жовтня 2014 р., Чернівці-Київ-Чикаго. – С. 365.
 39. Нефедов А.А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза / А.А. Нефедов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014 года, тезисы / Под редакцией С.Б. Середенина, Н.Г. Незнанова, Э.Э. Звартау; - Санкт-Петербург. – 2014. – С. 129.
 40. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження ненаркотичного анальгетика мелоксикама на поведінкові реакції у щурів із експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», 23-24 квітня 2015 р. – Суми. – С. 172. *(Особистий внесок дисертанта:*

розробка загальної концепції та схеми проведення наукової роботи, виконання експерименту)

41. Нефьодов О.О. Дослідження анальгетичних властивостей кеторолаку за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу // О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали міжнародної науково-методичної конференції «Актуальні питання медицини», 27 березня 2015 р. – Дніпропетровськ. – С. 171-173.
42. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментальної патології ЦНС / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик, В.В. Кривошей // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів», 24-25 квітня 2015 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 94-95.
43. Нефьодов О.О. Вивчення впливу антиконвульсанта габапентину на поведінкові реакції у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальна та клінічна медицина», 20-22 травня 2015 р. – Київ, 2015. – С. 45-46.
44. Нефьодов О.О. Аналіз впливу цитиколіну на безумовно-рефлекторну активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов // Хист. – 2015. – вип. 17. – С. 378.
45. Нефьодов О.О. Дослідження впливу амітриптиліну на поведінкові реакції в щурів у тесті «відкрите поле» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Матеріали II науково-практичної конференції з міжнародною участю «Природничі читання», 14-17 травня 2015 року. – Чернівці, 2015. – С. 179-180.
46. Нефьодов О.О. Вивчення впливу α -ліпоевої кислоти на поведінкові реакції у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу

- / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2015. - №1 (22). – С. 151.
47. Нефьодов О.О. Дослідження впливу лорноксикаму на дослідно-орієнтовану функцію ЦНС у щурів за умов експериментального моделювання розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015», 14-15 травня 2015 р. – Запоріжжя. – С. 30.
48. Nefedov A.A. Experimental analysis of neuroprotective agent in cognitive deficiency development in the modeling of multiple sclerosis / A.A. Nefedov, O.V. Khomiak, E.Y. Kovalenko // Abstract book 8 International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, 14-15 may 2015. – Kharkiv. – 2015. – P. 198.
49. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу парацетамолу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я», 30 квітня 2015 року. – Київ. – С. 47-48.
50. Нефьодов О.О. Особливості антиноцицептивних ефектів антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23-24 жовтня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 98-100.
51. Нефьодов О.О. Розсіяний склероз: патогенетичні механізми розвитку та особливості перебігу в експерименті / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, С.М. Дронов, О.В. Кривошей // Матеріали III Міжнародної науково-

- практичної конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління», 1-9 листопада 2015 р. –Будапешт-Прага-Київ, 2015. – С. 159-166.
- 52.Нефьодов О.О. Місце антиконвульсанта топірамата у знеболенні при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії», 9-10 листопада 2015 р. – Вінниця, 2015. – С. 193-194.
- 53.Нефьодов О.О. Дослідження місця габапентину та прегабаліну при ноцицепції за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», 22-23 жовтня 2015 р. – К.: вид-во «Мегапринт», 2015. – С. 81-82.
- 54.Нефедов А.А. Изучение анальгетического потенциала антидепрессанта в терапии невропатического болевого синдрома в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, Н.А. Ковтуненко, Л.А. Легкая // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини», 18-19 грудня 2015 року. – Одеса. –С. 120-122.
- 55.Нефьодов О.О. Експериментальна оцінка впливу антиконвульсантів габапентину та прегабаліну на поведінкові реакції в тесті «відкрите поле» за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції розвитку медичної науки та медичної практики», 25-26 грудня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 140-141.
- 56.Нефьодов О.О. Фармакокінетичні особливості вибору знеболюючого засобу за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, С.М. Дронов, В.С. Смандич, О.В. Кулик // Матеріали

XXXIII Всеукр. наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», 08 квітня 2016 року. – Х. : НФаУ, 2016. – С. 143-144.

57. Нефьодов О.О. Вивчення біофармацевтичної взаємодії антиконвульсанта з глюкокортикостероїдом за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, О.В. Кулик // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», 24-25 листопада 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 59-60.

ЗМІСТ

	С.
АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	25
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	32
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	34
ВСТУП	34
РОЗДІЛ 1. РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ: ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ ТА СТРАТЕГІЧНІ НАПРЯМКИ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ЗАХВОРЮВАННЯ <i>(огляд літератури)</i>	44
1.1. Особливості епідеміології, етіопатогенезу та клінічних форм розсіяного склерозу.....	44
1.2. Больовий синдром та особливості його перебігу при розсіяному склерозі.....	57
1.3. Сучасна стратегія фармакотерапії розсіяного склерозу	67
1.4. Особливості нейропротекції при розсіяному склерозі	73
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	81
2.1. Об'єкт та предмети дослідження	81
2.1.1 Характеристика лабораторних тварин, залучених до експериментальних досліджень...	81
2.1.2 Характеристика лікарських засобів, які використані в дослідженні.....	82
2.2. Методи дослідження	84
2.2.1 Відтворення еквіваленту розсіяного склерозу у щурів.....	84
2.2.2 Методи дослідження інтегративних функцій мозку.....	89
2.2.2.1 Дослідження рухово-дослідницької активності.....	89

2.2.2.2	Визначення впливу на процеси навчання та консолідації енграм пам'яті.....	89
2.2.3	Дослідження анальгетичної активності.....	91
2.2.4	Оцінка м'язового тону.....	92
2.2.5	Методи дослідження нейротропних ефектів антидепресантів.....	92
2.2.5.1	Аналіз антидепресивної активності....	92
2.2.5.2	Дослідження здатності потенціювання медикаментозного сну.....	93
2.2.6	Методи дослідження невропатичного больового синдрому, індукованого експериментальним алергічним енцефаломієлітом.....	94
2.2.6.1	Оцінка тактильної алодинії.....	94
2.2.6.2	Вивчення проявів хімічної гіпералгезії	95
2.2.6.3	Аналіз проявів термальної гіпералгезії	95
2.2.7	Біохімічні дослідження.....	96
2.2.7.1	Дослідження маркерів оксидантно-антиоксидантної напруги.....	96
2.2.7.2	Метод визначення активності простагландин Н-синтетази (ЦОГ).....	98
2.2.7.3	Дослідження мітопротективної активності.....	100
2.2.7.4	Методи визначення вуглеводно-енергетичного обміну.....	100
2.2.8	Оцінка фармакокінетичної сумісності інгредієнтів комбінацій-лідерів.....	104
2.2.9	Гістоморфометричні методи дослідження.....	105

2.2.10	Статистична обробка результатів	107
РОЗДІЛ 3.	ОЦІНКА СПЕКТРУ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕОПІОЇДНИХ АНАЛЬГЕТИКІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ.....	109
3.1.	Порівняльний аналіз антиноцицептивної активності неопіоїдних анальгетиків у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном.....	109
3.2.	Вплив знеболюючих засобів на поведінкові реакції щурів за умов експериментальної патології.....	115
3.3.	Оцінка змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з болезаспокійливими засобами за умов ЕАЕ.....	121
3.4.	Вивчення нейрохімічних змін активності PGH– синтази за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.....	124
3.5.	Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому та демієлінізуючої патології.....	126
3.6.	Оцінка ультраструктурних змін деяких утворень мозку на фоні введення неопіоїдних анальгетиків за умов ЕАЕ.....	134
3.6.1	Характеристика ультраструктурних змін фронтальної кори та гіпокампу при формуванні експериментального алергічного енцефаломієліту.....	135

3.6.2	Динаміка змін цитоархітекτονіки деяких утворень головного мозку лабораторних щурів за умов ЕАЕ під впливом інтраперитонеального введення метилпреднізолону.....	144
3.6.3	Оцінка ультраструктурних змін фронтальної кори та гіпокампу під впливом мелоксикаму за умов ЕАЕ на фоні глюкокортикоїдної терапії.....	152
3.7.	Резюме.....	159
РОЗДІЛ 4.	ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗАСОБІВ ЗНЕБОЛЮЮЧОЇ АД'ЮВАНТНОЇ ТЕРАПІЇ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ.....	162
4.1.	Дослідження змін антиноцицептивного потенціалу антиконвульсантів у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном.....	163
4.2.	Вплив антиконвульсантів на дослідно-орієнтовні реакції щурів за умов експериментальної патології....	168
4.3.	Вивчення змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з протисудомними засобами за умов ЕАЕ.....	173
4.4.	Оцінка нейрохімічних змін в утвореннях мозку на фоні введення досліджуваних комбінацій за умов ЕАЕ.....	175

4.5.	Дослідження впливу антиконвульсантів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі базової терапії метилпреднізолоном.....	178
4.6.	Комп'ютерне моделювання взаємодії метилпреднізолону (базова гормонотерапія експериментального алергічного енцефаломієліту) та габапентину (ад'ювантного засобу знеболюючої терапії): особливості використання в одній лікарській формі.....	183
4.7.	Оцінка ультраструктурних змін деяких утворень мозку на фоні введення антиконвульсантів за умов ЕАЕ.....	191
4.8.	Резюме	197
РОЗДІЛ 5.	ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ АНТИДЕПРЕСАНТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ.....	199
5.1.	Порівняльна характеристика знеболюючої активності антидепресантів у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном.....	200
5.2.	Вплив антидепресантів на поведінкові реакції щурів за умов експериментальної патології.....	205
5.3.	Оцінка змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з антидепресивними засобами за умов ЕАЕ.....	210

5.4.	Вивчення антидепресивної активності дослідних комбінацій за умов ЕАЕ.....	212
5.5.	Дослідження здатності антидепресантів потенціювати медикаментозний сон за умов ЕАЕ на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.....	214
5.6.	Аналіз впливу антидепресантів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефалітом на тлі базової терапії метилпреднізолоном.....	216
5.7.	Резюме	222
РОЗДІЛ 6.	АНАЛІЗ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗАСОБІВ НЕЙРОПРОТЕКТИВНО-АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ.....	224
6.1.	Дослідження впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на латентний період ЕАЕ, його тривалість та тяжкість неврологічних розладів.....	225
6.2.	Оцінка впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на процеси навчання та консолідації енграм пам'яті за умов ЕАЕ.....	231
6.3.	Аналіз впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на рухово-дослідницьку активність в тесті «відкрите поле».....	237
6.4.	Вивчення впливу комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» на процеси енергозабезпечення і функціональний стан мітохондрій нейронів кори головного мозку за умов ЕАЕ.....	244

6.5.	Аналіз впливу комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» на ультраструктуру фронтальної області неокортекса та гіпокампа за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу	254
6.5.1	Аналіз цитоархітекτονіки фронтальної області неокортекса.....	255
6.5.2	Оцінка ультраструктурних змін гіпокампу...	257
6.6.	Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу.....	261
6.7.	Резюме.....	270
РОЗДІЛ 7	УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	272
	ВИСНОВКИ.....	300
	ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	302
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	303
	ДОДАТКИ.....	344

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

РС – розсіяний склероз;
ЕАЕ – експериментальний алергічний енцефаломієліт;
ЦНС – центральна нервова система;
НПЛЗ – нестероїдні протизапальні лікарські засоби;
ННА – неопіїдні анальгетики;
ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр;
ОДЦ – олігодендроцити;
ІЛ – інтерлейкіни;
ФНП – фактор некрозу пухлин;
РТ – рецидивуючий тип;
ВПТ – вторинно-прогресуючий тип;
ППТ – первинно-прогресуючий тип;
РБН – ретробульбарний неврит;
МРТ – магнітно-резонансна томографія;
ГМ – головний мозок;
СМ – спинний мозок;
КС – кортикостероїди;
ГКС – гемопоетичні стовбурові клітини;
АТСК – аутологічна трансплатація стовбурових клітин;
ВІСТ – високодозна імуносупресивна терапія;
ПАФ – повний ад'ювант Фрейнда;
ЕЕРС – експериментальний еквівалент розсіяного склерозу;
ВРО – вільнорадикальне окислення;
УРПУ – умовна реакція пасивного уникнення;
КАа – коефіцієнт антиамнестичної активності;
КПБВ – коефіцієнт переваги безпечного відсіку;
КФГ – кетонфенілгідрозони;
ЛП – латентний період;

МД – мітохондріальна дисфункція;
МП – мітохондріальна пора;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АДФ – аденозиндифосфат;
АМФ – аденозинмонофосфат;
МДА – малоновий діальдегід;
ОМБ – окислювальна модифікація білка;
СОД – супероксиддисмутаза;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
РНК – рибонуклеїнова кислота;
М – метилпреднізолон;
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів;
ЕГС – енцефалітогенна суміш;
ДЛМ – дихальний ланцюг мітохондрій;
АФК – активні форми кисню;
АОЗ – антиоксидантний захист;
NO – оксид азоту;
iNOS – індуцибельна NO-синтаза.
ТБК – тіобарбітурова кислота;
Ψ - мітохондріальний трансмембранний потенціал, мембранний заряд;
ЕПР – ендоплазматичний ретикулум.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Актуальність теми. В структурі сучасної неврологічної патології одне з провідних місць займають нейродегенеративні захворювання [205, 285]. Як зазначається рядом дослідників [103, 270, 283], найбільш поширеною патологією нейродегенеративного характеру, що вражає переважно людей молодого працездатного віку (16-45 років) та швидко приводить до інвалідизації, є розсіяний склероз (РС) – хронічне аутоімунне захворювання, при якому ушкоджується мієлінова оболонка нервових волокон головного і спинного мозку. 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'єлінізація) білої речовини головного та спинного мозку [86, 303].

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 [287, 292]. Діагностика нейродегенеративних захворювань на ранніх етапах і використання сучасних лікарських засобів дозволяє впливати на прогноз перебігу хвороби та істотно поліпшити якість життя хворих.

Водночас на сьогодні у хворих на РС все більшої актуальності набуває проблема больового синдрому. 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, при цьому не менше 40 % з них характеризують його як постійний [5, 7, 42, 198]. Біль при розсіяному склерозі може проявлятися у вигляді

соматичних ноцицептивних синдромів, пов'язаних із м'язово-скелетним та хронічним болем, або ж невропатичного (дизестезичного чи трункального) болю [75].

В терапії ноцицептивних больових синдромів при РС активно застосовують нестероїдні протизапальні препарати, з метою зменшення побічних ефектів яких (ульцерогенна дія, підвищення рівня глікемії тощо) рекомендовано, насамперед, використання селективних блокаторів циклооксигенази 2 типу [5, 42]. Водночас в терапії невропатичних больових синдромів при РС високу терапевтичну ефективність виявляють так звані ад'ювантні знеболюючі засоби – антиконвульсанти [7, 42] та антидепресанти [95, 234].

Однак всіма дослідниками проблеми больового синдрому при РС наголошується, що натеper немає єдиної думки на причини виникнення, механізми розвитку, згідно з віком, статтю, тяжкістю хвороби [8, 75]. Досі залишаються дискутабельними питання співвідношення болю і клінічних особливостей РС [8, 42, 213]. До того ж, на сьогодні не існує єдиної систематизації больових синдромів при розсіяному склерозі, а також не висвітлені питання їх інформаційно-структурного аналізу.

У доступній нам літературі знайдено лише поодинокі повідомлення про можливий початок розсіяного склерозу з больового синдрому. Біль, як симптом дебюту, описують від 8 до 21% випадків [42, 198]. Не виявлено жодного дослідження, спеціально присвяченого аналізу больового дебюту, можливості прогнозування перебігу захворювання в залежності від виду больового синдрому, який сформувався на початку хвороби.

Ефективна терапія больового синдрому при розсіяному склерозі в даний час також є актуальним і в повному обсязі невирішеним завданням. Проведені в Данії дослідження показали, що повноцінну знеболюючу терапію отримують тільки 42% хворих РС [8, 293].

Водночас 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 [71, 205, 163].

Відносною, наближеною моделлю демієлінізуючих захворювань людини (в т.ч. розсіяного склерозу) є відтворюваний в лабораторних умовах експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ). Однак біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при ЕАЕ мають принципову схожість з аналогічними змінами, що супроводжують аутоімунні демієлінізуючі ураження нервової системи в клініці, що дає підставу вважати експериментальний алергічний енцефаломієліт адекватною та оптимальною моделлю, яка дозволяє суттєво розширити межі досліджень питань етіології, патогенезу, терапії та профілактики демієлінізуючих захворювань [2, 239].

Все вищевказане визначає наукову та практичну значимість поглиблених порівняльних фармакодинамічних та фармакокінетичних досліджень використання знеболюючих та нейропротекторних засобів за умов базової гормонотерапії розсіяного склерозу, що може слугувати теоретичними передумовами оптимізації фармакотерапії больового синдрому та медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

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), «Системна фармакологія неопіїдних анальгетиків та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах патологічних станів» (№ держреєстрації 0114U000935).

Мета роботи та завдання дослідження. Експериментально-теоретичне обґрунтування раціонального і безпечного використання класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової гормонотерапії.

Згідно з метою дослідження були сформовані наступні задачі:

1. Визначити спектр особливості знеболюючої активності неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.
2. Провести аналіз нейротропної активності протисудомних засобів за умов модельованої патології ЦНС.
3. Оцінити антиноцицептивний потенціал антидепресантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.
4. Провести порівняльний фармакологічний аналіз засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу за умов експериментальної модельованої демієлінізуючої патології.
5. Провести аналіз фізико-хімічної сумісності комбінацій-лідерів за умов комбінованого введення.
6. Провести аналіз ультраструктурних змін в корі великих півкуль та гіпокампі за умов експериментального алергічного енцефаломієліту та використанням комбінацій-лідерів знеболюючої та нейропротективної терапії.
7. Обґрунтувати принципи раціонального та безпечного використання класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах експериментального алергічного енцефаломієліту з урахуванням базової гормонотерапії патології в експерименті.

Об'єкт дослідження: больовий і невропатичний синдром та когнітивна дисфункція за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Предмет дослідження: усунення болю шляхом застосування ряду неопіїдних і ад'ювантних анальгетиків та корекція когнітивних і

нейродегенеративних порушень засобами нейропротективно-антиоксидантного комплексу при ЕАЕ.

Методи дослідження: поведінкові, біохімічні, фармакологічні, нейрохімічні, гістоморфологічні та статистичні.

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 ферменту 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 непрямому механізмі 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 сфінгомиеліну 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 і впровадження результатів наукової роботи.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в поглибленні уявлень про фармакодинамічні та фармакокінетичні 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.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійно завершеною науковою працею. За участю наукового консультанта обраний напрямок дослідження, сформульовані мета та задачі, а також об'єм методичних

підходів. Автором самостійно проведений інформаційно-патентний пошук, проведений аналіз літературних даних, відпрацьовані моделі та методи досліджень, проведені експериментальні дослідження, статистична обробка отриманих даних, систематизація отриманих результатів та їх наукова інтерпретація, сформульовані висновки та практичні рекомендації. Оформлення дисертаційної роботи та автореферату виконані дисертантом самостійно. Робота виконана на кафедрі фармакології і клінічної фармакології ДЗ «ДМА МОЗ України» (завідувач – к.мед.н., доцент С.М. Дронов). Дослідження енергозабезпечуючої функції мітохондрій та морфометричний аналіз нейронів виконані за консультативної допомоги зав. ЦНДЛ Запорізького державного медичного університету, д.мед.н., проф. А.В. Абрамова. Біохімічні та фармакологічні дослідження проведені за консультативної допомоги доцента кафедри загальної та біологічної хімії, к.мед.н. А.В. Мельника Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова. Комп'ютерне моделювання фармакокінетичної сумісності досліджуваних препаратів проведені за консультативної допомоги завідувача відділу фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, академіка НАМН України, проф. М.Я. Головенко та с.н.с., д.б.н. В.Б. Ларіонова. Виявлення ультраструктурних змін утворень головного мозку проведено в лабораторії електронної мікроскопії ДЗ «ДМА МОЗ України» під керівництвом д.мед.н., проф. І.В. Твердохліба.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи представлені на: Науково-практичній конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації» (Будапешт-Прага-Київ, 2014), XV конгресі СФУЛТ (Чернівці-Київ-Чикаго, 2014), Всеросійській конференції с міжнародною участю, присвяченої 90-річчю з дня народження академіка АМН СРСР Артура Вікторовича Вальдмана «Інновації в фармакології: від теорії до практики» (Санкт-Петербург, 2014), III Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 2015), II Міжнародному

медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Пріоритети та перспективи молодіжної науки» (Чернівці, 2015), III Міжнародній науково-практичній конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління» (Будапешт-Прага-Київ, 2015), Підсумковій LVIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої пам'яті ректора, члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука) (Тернопіль, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015» (Запоріжжя, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я» (Київ, 2015), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії» (Вінниця, 2015), III Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Одеса, 2015), XXXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2016), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016).

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

Обсяг та структура дисертаційної роботи. Дисертація складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що включає 334 посилання (з них 209 із кириличної графікою, 125 - із латинською) та додатків. Робота викладена на 373 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 45 таблицями та 52 рисунками.

РОЗДІЛ 1

РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ: ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ ТА СТРАТЕГІЧНІ НАПРЯМКИ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ЗАХВОРЮВАННЯ

(огляд літератури)

1.1. Особливості епідеміології, етіопатогенезу та клінічних форм розсіяного склерозу

Розсіяний склероз (РС) – найбільш поширене демієлінізуюче захворювання ЦНС, що вражає переважно людей молодого працездатного віку (16-45 років) та швидко приводить до інвалідизації, тому являється одним з актуальних питань сучасної неврології [13, 40].

За останні два десятиліття спостерігається збільшення поширеності РС в окремих регіонах, підвищення кількості випадків та зміна його вікових меж як у світі, так і в Україні.

За даними ВООЗ, серед неврологічних захворювань РС є основною причиною стійкої інвалідизації осіб молодого віку. Через 10 років від початку захворювання 30-37 % хворих здатні пересуватися лише зі сторонньою допомогою, 50 % хворих мають труднощі у виконанні професійних обов'язків, більше 80 % хворих змушені змінити роботу. Через 15 років тільки 50 % хворих зберігають здатність працювати, обслуговувати себе і вільно пересуватися без сторонньої допомоги. Смертність від РС у середньому становить 2 випадки на 100 тис. населення на рік [32, 45].

За показниками поширеності РС у світі виділяють 3 зони: зона високого ризику – поширеність більше 50 випадків на 100000 населення (північні райони США, південь Канади, південь Австралії, Нова Зеландія,

північна й центральна частини Європи); зона середнього ризику – поширеність від 10 до 50 випадків на 100000 населення (південь США, деякі області центральної та північної Європи, східна та південна Європа, остання територія Австралії); зона низького ризику – поширеність менше 10 випадків на 100000 населення (центральна та південна Америка, Азія, Африка, Океанія) [176].

Епідеміологічні дані щодо РС у світі є фрагментованими та в основному доступні для країн із високим рівнем доходів.

У 2013 р. опублікований Атлас РС, розроблений Міжнародною федерацією розсіяного склерозу (Multiple Sclerosis International Federation — MSIF), який доповнює попередній Атлас РС 2008 р. Атлас в основному заповнювався пацієнтами, а також спеціалістами в галузі неврології та РС. Усього було отримано результати від 104 зі 193 країн [103, 317].

Станом на 2013 р. у світі налічувалося близько 2,3 млн хворих на РС порівняно з 2,1 млн хворих у 2008 р. РС на сьогодні діагностують у будь-якому регіоні світу. Найвищі рівні захворюваності відзначалися у країнах Північної Америки та у Європі (140 і 108 на 100 тис. населення відповідно), найнижчі — у Центральній та Південній Африці та Східній Азії (2,1–2,2 на 100 тис. населення). Найвища поширеність РС серед країн Європи зафіксована у Швеції (189 на 100 тис.), найнижча — в Албанії (22 на 100 тис. населення). Поширеність РС змінюється відповідно до географічної широти. Наприклад, серед країн Південної Америки найвища захворюваність властива Аргентині (18 на 100 тис. населення), тоді ж як найнижча — Еквадору (3,2 на 100 тис. населення). Співвідношення жінок до чоловіків серед осіб із РС становить 2:1 та є стабільним порівняно з 2008 р. Однак в окремих країнах це співвідношення становить 3:1 (Східна Азія); 2,6:1 (Америка). У 2–6% пацієнтів із діагностованим РС вік молодше 18 років, пацієнти старше 59 років зустрічаються в 0,6% випадків [20, 103, 291].

Проблема РС надзвичайно актуальна в Україні, оскільки РС посідає 2-ге місце з інвалідизації серед хвороб нервової системи [48].

За даними МОЗ України за останні роки відмічається явна тенденція до росту захворюваності на РС. Якщо станом на 2005 рік в Україні налічувалося 18 394 особи (48,4 на 100000 населення) з діагностованим РС, з них 1145 нових випадків (3 випадки на 100 000 населення), то у 2013 р. в Україні зареєстровано серед дорослого населення 20 674 хворих на РС, що становить 55,3 на 100 тис. населення, із них вперше захворіли на РС 1196 мешканців, що становить 3,2 на 100 тис. населення. Найвища поширеність у 2013 р. зареєстрована у Волинській (101,0 на 100 тис. населення), Тернопільській (88,5 на 100 тис. населення), Полтавській (76,8 на 100 тис. населення) областях, найнижча — у Кіровоградській (27,4 на 100 тис. населення), Донецькій (28,2 на 100 тис. населення) та Одеській (26,5 на 100 тис. населення) областях. Найвища захворюваність на РС у 2013 р. відзначена в Івано-Франківській (5,5 на 100 тис. населення), Вінницькій (4,7 на 100 тис. населення), Волинській (4,5 на 100 тис. населення) та Хмельницькій областях (4,1 на 100 тис. населення), найнижча — у Донецькій (1,8 на 100 тис. населення), Одеській, Миколаївській (2,0 на 100 тис. населення) областях та місті Севастополі (0,6 на 100 тис. населення) [45, 48, 103].

РС вважається захворюванням з невідомою етіологією, що розвивається під впливом різних чинників, які можуть бути ендогенними — генетична схильність, чи екзогенними — широкий ряд зовнішніх факторів, який ще поповнюється з отриманням результатів нових досліджень.

РС не являється спадковим захворюванням, але результати спостережень вказують на наявність певної спадкової (генетичної) схильності [60, 175, 176].

За даними генетичних та хромосомних досліджень, однією з генетичних детермінант по РС є гени ГКГ— людські лейкоцитарні антигени (HLA), розміщені на 6-й хромосомі. HLA необхідні для розпізнавання чужорідних речовин Т-лімфоцитами. Схильність до РС пов'язана з алелем HLA-DR2HLA II класу та відповідним галотипом HLA-DRB14501, HLA-

DQA1*0102, HLA-DQB1*0602. Подальші спроби локалізувати генетичний дефект на ділянці DR-DQ були безуспішними через сильне зщеплення генів в даній області[164, 167]. Аналіз ряду інших генів-кандидитів, що мають важливе значення в механізмах реалізації імунної відповіді, дозволив установити існування додаткових ланок генетичної системи схильності до РС. До таких ланок відносяться гени особливого сімейства протизапальних цитокінів – ФНП, для яких показано переважання певних «неблагоприємних» алелей в групі хворих РС. Оскільки гени ФНП тісно зчеплені з локусом HLA-DR на 6-й хромосомі, вказаний специфічний розподіл алелей ФНП може бути в деякій мірі зумовлений наявністю достовірної асоціації поміж алелями HLA- комплексу та РС. Ще одним геном схильності до РС є ген b -ланцюга антигенрозпізнавальних рецепторів Т-лімфоцитів на 7-й хромосомі: показаний зв'язок «неблагоприємних» алелей даного гена з проградієнтною формою РС і ЕАЕ, особливо при сполученому успадкуванні з певними алелями комплексу HLA [45, 52, 58, 61, 103].

Отже, з наведених даних можна говорити про те, що сучасний рівень знань відповідає уявленню про «оркестр» генів ГКГ, які знаходяться в нерівноважному щепленні та епістатичній взаємодії, регулюючи залучення один одного у формування схильності до РС.

Певне значення для розвитку РС, вірогідно, має й епігенетична регуляція, не пов'язана зі змінами нуклеотидної послідовності геному, але яка впливає шляхом ковалентної модифікації ДНК або гістонових білків на рівень транскрипції генів, та виникнення спонтанних генетичних змін, таких як хромосомні аберації або соматичні перебудови генів Т-клітинних рецепторів й імуноглобулінів [61, 64, 87, 175, 176].

Зовнішні фактори розвитку при РС мають модифікуючий вплив та можуть бути розділеними на групи: географічні (клімат, географічна зона), інфекційні (наявність мікроепідемій та просторово-часових кластерів, вірус Епштейна-Барр, віруси дитячих інфекцій, хронічні бактеріальні інфекції носоглотки, віруси групи герпесу та грипу, ретровіруси), інтоксикації

(органічні розчинники, бензин та продукти його переробки, отрутохімікати, екологічні характеристики району проживання), образ життя (переважання в харчуванні тваринних жирів та білків (м'яса), недостатність в харчуванні вітаміну D та вітаміну A, хронічний психо-емоційний стрес) [45, 103, 176, 184, 205].

В справжній час найбільш обґрунтованими зовнішніми факторами ризику вважаються інфекції. На користь вірусної етіології РС свідчать описані епідемічні спалахи захворювання, зв'язок його дебюту або загострення з перенесеною вірусною інфекцією, створення різних вірусоіндукованих моделей ЕАЕ, ідентифікація вірусів і противірусних антитіл у хворих. На доказ вірусної концепції РС автори численних клінічних досліджень наводять дані про підвищення титру антитіл до вірусів кору, краснухи, паротиту, вітряної віспи, простого герпесу, грипу і парагрипу [322, 332]. Гіпотетично передбачається контакт із вірусом під час внутрішньоутробного періоду або в ранньому дитинстві з подальшою персистенцією вірусу і розвитком захворювання після тривалого латентного періоду. Виникнення РС нерідко асоційоване з вірусом Епштейна-Барр, який найімовірніше провокує або моделює аутоімунний процес при РС. Очевидно, аутоімунний процес «запускає» не один конкретний вірус, а їх поєднання або ще не відомий вірус [32, 45, 49].

І спадкові, і зовнішні фактори мають не тільки етіологічне значення, але і формують своєрідність фенотипічних проявів патологічного процесу, тобто особливості клінічного перебігу захворювання. Також, існує ряд факторів, наприклад, черепно-мозкова травма, вагітність, дитячий вік, які не відносяться до причинних, але суттєво впливають на розвиток клінічної картини [176, 184, 185].

Незважаючи на те що процеси, які відбуваються при РС у ЦНС, вимагають подальшого вивчення, безперечним є той факт, що в розвитку захворювання важливу роль відіграє імунна аутоагресія з пошкодженням мієліну та аксонів [20, 28, 40, 52, 62, 64, 170, 235]. Саме аксональне

пошкодження при РС призводить до формування незворотного неврологічного дефіциту та зростаючої інвалідності [78, 103, 232].

В основі патогенезу РС виділяють, як головні процеси, запалення та нейродегенерацію, що проявляється дифузним пошкодженням аксонів та апоптозом нейронів [20, 46, 52, 58, 87, 163, 164, 204, 233, 277]. Маніфестує РС із запальних процесів, внаслідок чого відбувається функціональна та структурна перебудова клітинного складу ЦНС, яка в подальшому провокує дегенеративні зміни [204, 205, 226].

Умовно в розвитку РС можна виділити кілька послідовних етапів:

I - розвиток імунологічних реакцій на периферії та в ЦНС;

II - демієлінізація;

III - аксональна дегенерація.

Доведено що потенційно агресивні Т-клітини, специфічні до основного білка мієліну та інших антигенів ЦНС, існують і в нормальній імунній системі, в мінімальній кількості та в неактивному стані [284]. В ролі активаторів (тригерів) аутореактивних Т-лімфоцитів виступають наведені вище фактори. Активовані антигеном Th-клітини з CD4-рецепторами, специфічних для епітопів мієліну та ОДЦ з допомогою адгезивних молекул (молекул адгезії судинних клітин, молекул міжклітинної адгезії та селектинів) та цитокінів прикріплюються до ендотелію судин ГЕБ, підвищують його проникність та проникають в ЦНС, викликаючи інфільтрацію периваскулярного простору Th-клітинами за рахунок модифікації цитокінами міжклітинних контактів ГЕБ [46, 58, 61, 73, 169, 175, 205, 220]. Т-лімфоцити реактивуються після взаємодії з антигенпрезентуючими макрофагами ЦНС, які несуть на своїй поверхні антигени мієліну [62, 169]. CD4+ Т- клітини особливо цікаві в патології РС, так як вони можуть диференціюватися як в прозапальні Th-1 і Th-17, так і протизапальні Th- 2, або Т-регуляторні клітини в залежності від мікрооточення і стимулюючих цитокінів [46]. У хворих на РС CD4+ Т-клітини мають тенденцію до диференціації Th-1 та/або Th-17, які є не тільки

прозапальними, але навіть потенційно нейротоксичними [283]. Основними мішенями агресивних Т-клітин та цитокінів являються мієлінпродукуючі клітини, ОДЦ, мієлін і нейрон [20, 28, 52, 60, 62, 87]. Активовані Т-клітини і вторинно залучені до процесу макрофаги і клітини мікроглії виділяють різні прозапальні цитокіни, які мають здатність індукувати адгезивні рецептори на ендотеліальних та імунних клітинах, а також посилювати міграцію відповідних імунокомпетентних клітин у вогнище запалення [176, 204]. Активність запалення корелює з рівнем щільності адгезивних молекул. Продукція цитокінів вторинно підвищує проникність ГЕБ. Антигенпрезентуючі клітини включаються в процес послідовно: спочатку активізуються периваскулярні моноцити й мікроглія, потім перицити й, можливо, ендотеліальні клітини та астроцити. Гліальні клітини та Th-1 експресують ІФН- γ , ФНП, ІЛ - 1, 2, 6, 12. Прозапальні цитокіни притягують з крові інші клітини, зокрема В-лімфоцити, які виробляють антитіла до мієліну, Т(СD-8) -кілери та моноцити, що «пожирають» мієлін. Таким чином формуються переваскулярні вогнища аутоімунної демієлінізації. В процесі пошкодження ОДЦ та мієліну вивільняється велика кількість аутоантигенів, що дають поштовх подальшому розвитку аутоімунного процесу - феномен, відомий як „епітопне поширення”, що полягає в каскадному вивільненні нових антигенів та появі змінених антигенів [20, 52, 58, 61, 64, 87, 95, 145].

Гетерогенність демієлізуючого процесу при РС зумовлена перевагою тих чи інших імунопатологічних механізмів у різних хворих. На основі широких імуногістостологічних досліджень активних вогнищ демієлінізації (за даними стереотаксичної біопсії та аутопсії) запропоновано 4 різних типи руйнування мієліну: аутоімунна демієлінізація, зумовлена Т-лімфоцитами (макрофаг-асоційована), аутоімунна демієлінізація, зумовлена В-лімфоцитами (антитіло-індукована), дистальна олігодендропатія та їх апоптоз, первинна дегенерація ОДЦ [40, 73].

1-й та 2-й типи більш характерні для ремітуючого перебігу РС, тим часом як 3-й та 4-й – для прогресуючого РС. Якщо в пацієнта є в наявності один з типів демієлізації, то ознаки іншого зазвичай не знаходяться.

Периваскулярні вогнища, що утворюються при описаних патологічних змінах при РС мають назву бляшок

По волокнам у вогнищах запалення та демієлінізації порушується проведення імпульсу, що приводить до виникнення клінічних симптомів. При довготривалому та вираженому процесі демієлінізації настає загибель аксонів, що призводить до появи стійких симптомів [175, 176].

Одночасно з процесом демієлінізації йде і ремієлінізація, що особливо помітно на краях активної бляшки. Але незважаючи на появу процесу ремієлінізації вже на ранніх стадіях утворення бляшки, відновлення мієлінової оболонки відбувається недостатньо ефективно. Чим триваліший перебіг захворювання, тим менш виражений процес ремієлінізації, що може бути пов'язано зі значним зменшенням кількості ОДЦ [73, 98, 176].

Основними причинами загибелі аксона є підвищення проникності його мембрани, патологічний внутрішньоклітинний біохімічний каскад і порушення аксонального транспорту. Можна припустити, що втрата аксонів пов'язана із запаленням на основі того, що вогнища максимального пошкодження аксонів знаходяться близько до місць запальної інфільтрації. На цій стадії ОДЦ та демієлінізовані аксони піддаються дії запальних медіаторів. Вони можуть ушкоджувати аксони безпосередньо або опосередковано через певні рецептори [204, 205].

Рецепторно-залежне пошкодження ОДЦ викликається цитокінами із родини ФНП, які виділяються активованими Th1-клітинами. Вони діють на так звані «рецептори смерті», що знаходяться на ОДЦ в активних вогнищах. Крім того, аксони власноруч можуть стимулювати експресію молекул ГКГ II класу, які розпізнаються Т-лімфоцитами. Вони кріпляться до демієлізованого аксону та виділяють різні прозапальні цитокіни, в тому числі й перфорин, які руйнують клітинну мембрану аксона. Активна участь Т-лімфоцитів в

розвитку аксональної патології підтверджується тим, що ступінь аксонального пошкодження корелює з кількістю імунних клітин у вогнищах РС [204].

Рецепторно-незалежне пошкодження аксонів зумовлено дією оксиду азоту, глутамату та протеаз, що продукуються мікроглією та макрофагами. Демієлізований аксон більше піддається запальним пошкодженням. Так, якщо в нормі іони натрію входять в аксон лише ділянках перехватів Ранв'є, то в демієлізованому аксоні це відбувається по всій його довжині. Оксид азоту ще більше посилює цей процес, і також призупиняє синтез АТФ в мітохондріях аксонів. Демієлізовані провідники можуть проявляти спонтанну активність, ектопічно генеруючи множинні додаткові імпульси. Подібна гіперзбудливість внаслідок хронічної демієлінізації може полегшувати виникнення й розвиток нейродегенеративних процесів. Крім того, демієлінізовані аксони позбавляються трофічного забезпечення з боку ОДЦ. Під час запальної атаки активовані імунні клітини виділяють велику кількість глутамату. Глутаматопосередкована ексайтотоксичність є важливою складовою частиною як демієлінізації, так і аксонального пошкодження. Велика увага надається оксиду азоту, який у великих кількостях знаходиться у вогнищах запалення. Оксидантне пошкодження мітохондріальних ДНК приводить до енергетичного дефіциту в нейронах і гліальних клітинах з розвитком їх дистрофії. У подальшому відбувається порушення функції іонних каналів з підвищеним надходженням іонів Na^+ в аксон, пошкодженням $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ помпи з надмірним проникненням Ca^{++} в аксон. Зазначені явища призводять до активації протеаз (калпаїн, матриксних металлопротеаз), які викликають деструкцію цитоскелету аксона [28, 52, 65, 78, 98, 162, 169, 203, 204, 312].

Кілька обставин перешкоджають відновленню аксонів після розвитку пошкоджень. Вони включають зменшення нейротрофічних факторів, що підтримують зростання, наявність гліальних рубців (фактор, що залежить від місця ураження) або наявність інгібуючих молекул, що перешкоджають росту аксонів. Останні дані свідчать про те, що наступна за пошкодженням

дегенерація аксонів має механізми, подібні з тими, які відповідають за програмовану смерть клітин (апоптоз) [290].

В зв'язку з тим, що основним патоморфологічним субстратом хвороби являється пошкодження мієліну в ЦНС, симптоматика РС, поперед всього, зумовлена ураженням провідних шліхів головного та спинного мозку [61, 175, 176]. Першими симптомами може стати ураження як однієї, так і декількох провідних систем (моно- та полісимптомний початок). За даними епідеміологічного дослідження великих груп все таки переважає полісимптомний варіант клінічного початку РС [222].

Всі симптоми при РС поділяються на класичні та рідкісні. До першої групи відносяться найбільш поширені симптоми, які є безпосереднім проявом ураження провідних систем ЦНС. Сюди ж відносяться й характерні для РС симптомокомплекси, що віддзеркалюють особливості клінічних проявів багатовогнищового демієлінізуючого процесу. Друга група включає рідкісні клінічні прояви захворювання, які можуть викликати труднощі при проведенні диференціальної діагностики.

Вираженість клінічних проявів залежить від локалізації демієлінізуючого процесу.

При ураженні пірамідних шляхів у 89 % [64] спостерігаються рухові розлади у вигляді пірамідного синдрому із слабкістю та спастичністю. В залежності від локалізації вогнища можуть спостерігатися парапарези, геміпарези і рідше монопарези. Як правило, більше й раніше до процесу залучаються нижні кінцівки. Руки страждають рідше і втягуються в процес на більш пізніх стадіях хвороби. Зниження сили супроводжується появою патологічних рефлексів, гіперрефлексією сухожилкових та періостальних рефлексів і зниженням, асиметрією чи випадінням шкірних черевних рефлексів. Останній симптом є тонким і раннім проявом залучення пірамідної системи в патологічний процес, але при цьому не являється специфічним симптомом. Стан м'язового тону може бути різноманітним –

від спастичного підвищення до гіпо- чи дистонії (при одночасному ураженні провідників пірамідного та екстрапірамідного шляхів) [61, 87, 175, 176].

Симптоми ураження мозочка та його зв'язків проявляються в 74% [64] випадків захворювання. Клінічні прояви є досить різноманітними: від епізодичного запаморочення, нерівності почерку, непомітної для навколишніх хиткості при ходьбі до грубої статичної та динамічної атаксії, дисметрії, промахування при виконанні вказівних проб, інтенційного тремору, скандованої мови. В тяжких випадках тремтіння кінцівок та тулуба проявляється навіть у спокої, що різко затрудняє самообслуговування хворого. Часто мозочкова симптоматика супроводжується м'язовою гіпотонією.

При ураженні черепно-мозкових нервів (58%) [64] частіше страждають окоруховий, трійний, відвідний та лицевий нерви – нерви бульбальної групи [63]. В силу залучення як ядерного чи над'ядерного, так і корінцевого рівнів в стовбурі ГМ може спостерігатися картина центрального та периферичного враження відповідних нервів. Частим симптомом при РС є ністагм. При ушкодженні лицевого нерва розвивається парез мимічних м'язів, частіше периферичного типу. Ураження трійчастого нерва найчастіше проявляється тригемінальним болем [4].

Окрему групу складають зорові та окорухові розлади (52%) [64]. Серед різноманітних порушень зору при РС найчастіше є зниження гостроти зору через розвиток ретробульбарного (оптичного) невриту (РБН), що характеризується різким, зазвичай одностороннім, зниженням гостроти зору, тривалістю не менше 24 годин, відчуттям болю підчас рухів очними яблуками, з повним або частковим відновленням зорової функції. На очному дні виявляється поблідніння скроневи половин дисків зорових нервів, пізніше субатрофія ДЗН, деколорація скроневої половини диску без клініки невриту (що є субклінічним проявом ураження зорового нерва) [233,261].

Вегетативні розлади проявляються у вигляді порушення функції тазових органів. Вважається, що порушення функції тазових органів рано чи

пізно виникають у 60 % [64] хворих на РС. Найбільш ранніми ознаками являються імперативні позиви до сечовипускання, збільшення їх частоти, затримка сечі, що пов'язано із нездатністю сечового міхура накопичувати сечу (синдром гіперрефлексії детрузора). Іншим патогенетичним напрямком порушення функції тазових органів є обструктивні порушення сечовипускання у вигляді синдрому неповного випорожнення сечового міхура через диссинергію скорочень детрузора і сфінктера, що з часом приводить до виникнення запальних захворювань нижніх та верхніх сечовивідних шляхів. Для пізніх термів хвороби характерною є триада Шарко: нетримання сечі, запори, імпотенція [176, 205]. Порушення функції тазових органів впливають на всі складові якості життя. Для людей працездатного віку клінічні прояви такого типу стають перешкодою для виконання професійних обов'язків, значно обмежують можливість вільного переміщення, порушують сон та особисті взаємовідносини, що з часом проявляється вторинними депресивними станами, непов'язаними з безпосереднім ушкодженням ЦНС [43, 45].

Частіше всього першими клінічними проявами РС є розлади чутливості (77%) [64]. На ранніх стадіях з'являються суб'єктивні чутливі розлади (парестезії) та нечіткі розлади больового чуття: відчуття «ватних ніг», оніміння щок, пальців, зниження больової чутливості з нечіткими межами, мозаїчного характеру чи об'єктивне зниження вібраційної чутливості від гомілок до реберних дуг. Пізніше виявляють порушення чутливості за провідниковим типом (пароксизмальна тригемінальна невралгія, хронічна дизестезія кінцівок, м'язово-скелетні болі), розлади м'язово-суглобової чутливості, наслідком чого є пропріоцептивна атаксія та аферентний парез. Больовий синдром зустрічається в 50-80% хворих, та часто має хронічний характер [4, 158, 194].

Серед нейропсихологічних порушень (62%) [64] слід перш за все виділити зниження інтелекту, порушення поведінки, сповільненість пізнавальних та емоційних функцій, зниження короткочасної пам'яті,

депресія, відчуття неспокою. Депресію пов'язують з демієлінізацією в скроневих долях. Для РС характерний синдром “постійної втомлюваності” (60-80 %), яка є наслідком швидкого виснаження психічних процесів та проявляється необхідністю частого відпочинку, сонливістю, затрудненням при виконанні повторних дій, що є серйозною проблемою для багатьох хворих, так як вони не можуть виконувати звичну для них роботу навіть в період ремісії.

До рідкісних клінічних проявів відносяться симптоми РС, що зустрічаються не більше ніж у 10% хворих. Яскравим прикладом є пароксизмальні стани, які характеризуються раптовим виникненням, раптовим припиненням та частою повторюваністю протягом доби (до 200-300 разів): тонічні спазми кінцівок та обличчя, які є досить болючими, приступи дизартрії і атаксії, симптом Лерміта, епінапади (фокальні та генералізовані), що пов'язані з демієлінізацією премоторної зони кори та ін. [40, 52, 58, 64, 87, 175, 176, 208].

Розрізняють чотири типи розвитку захворювання - ремітуючий, рецидивно-ремітуючий, вторинний прогресуючий і первинний прогресуючий РС. У 80% випадків розвиток захворювання починається з рецидивно-ремітуючого перебігу, для якого характерне чергування періодів загострення і відновлення. Висока частота загострень (42-57%) не дозволяє повністю відновити функції нейрорегуляції, що призводить до перманентних порушень. Згодом протягом 6-10 років у 30-40% пацієнтів РС переходить у вторинно-прогресуючий перебіг [322]. Значно рідше, в 20% випадків, РС відразу ж приймає первинно-прогресуючу форму [232].

Додатково виділяють особливі форми перебігу РС: доброякісний РС, злоякісний перебіг РС(хвороба Марбурга), транзиторно-прогресивний перебіг, прогресивно-рецидивуючий.

Для встановлення діагнозу РС використовують критерії W.I. McDonald та співавторів, які востаннє були переглянуті та опубліковані в 2010р. - McDonald, 2010. Слід наголосити, що ці критерії необхідно застосовувати

лише у випадках, коли РС є найточнішим поясненням клінічної симптоматики. Для балової оцінки інвалідизації використовується розширена шкала інвалідизації (Expanded Disability Status Scale - EDSS) (Kurtzke J.F. 1983).

1.2. Больовий синдром та особливості його перебігу при розсіяному склерозі

«Років десять-двадцять тому стверджувалося, що розсіяний склероз створює будь-які проблеми, тільки не біль. Насправді це не так», - зазначає доктор Франсуа Бету, директор служби реабілітації Центру вивчення та лікування розсіяного склерозу ім. Е. І Л. Мелленов при клініці р. Клівленд, США.

Проблема больового синдрому у хворих на РС на сьогодні набуває все більшої актуальності. 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, при цьому не менше 40 % з них характеризують його як постійний [194]. Хворі на РС при наявності больового синдрому більш інвалідизовані і соціально дезадаптовані, ніж хворі з аналогічним неврологічним дефектом, але без больового синдрому. Однією з найбільш актуальних проблем є діагностика чинників, що викликають та підтримують хронічний біль .

РС у 45% випадків дебютує саме з больового синдрому. Проведені дослідження не виявили залежності частоти виникнення больового синдрому при РС від віку, типу перебігу, тривалості перебігу чи неврологічного дефіциту [4, 6]. Біль частіше турбує жінок з гендерним співвідношення 1/3. Але достовірно відомо, що саме тип перебігу, тривалість хвороби та неврологічний дефіцит впливають на структурно-інформаційну динаміку болю [6]. На більш ранніх етапах, у хворих з ремітуючим перебігом та тривалістю захворювання до 5 років домінують спонтанні (стимулозалежні) дизестезичні болі. При збільшенні тривалості хвороби,

ступеню неврологічного дефіциту та зміною типу перебігу із ремітуючого на вторинно-прогресуючий в структурі больового синдрому переважають трункальні невропатичні болі. Початок РС частіше співвідноситься з дизестезіями та головним болем, тим часом, як для дебюту стають характерними трункальні болі, які більше ускладнюють нормальну життєдіяльність [58, 167].

Як відомо, біль поділяється на гострий і хронічний. Гострий біль — це сенсорна реакція з подальшим включенням емоційно-мотиваційних вегетативних та інших факторів при порушенні цілісності організму. Розвиток гострого болю пов'язаний, як правило, з цілком певними больовими подразненнями поверхневих або глибоких тканин, скелетних м'язів і внутрішніх органів, порушенням функцій гладкої мускулатури. Тривалість гострого болю визначається часом відновлення пошкоджених тканин і (або) порушеної функції гладеньких м'язів [30]. Хронічний біль характеризується тим, що зберігається після завершення гострої фази захворювання або після закінчення часу, достатнього для лікування. Причиною хронічного болю може бути периферичний ноцицептивний вплив, а також дисфункція периферичної або центральної нервової системи.

Відповідно сучасній патогенетичній класифікації біль поділяють на ноцицептивний, невропатичний та психогенний [4].

У клінічній практиці частіше доводиться зустрічатися з мікстними формами больових синдромів (поєднаний больовий синдром), що доцільно відображати в діагнозі для побудови лікувальної тактики [58].

Ноцицептивний біль пов'язаний з активацією больових рецепторів — ноцицепторів. До ноцицепторів належать високопорогові рецептори, що збуджуються під впливом сильних стимулів. Це відноситься насамперед до вільних нервових закінчень немієлінізованих волокон типу С, а також до мієлінізованих волокон типу А δ [89]. Згідно сучасним даним, периферичні рецептори цих нейронів у великій кількості містяться в різних тканинах та органах і мають безліч кінцевих розгалужень з дрібними аксоплазматичними

відrostками, які і є структурами, що активуються больовим впливом. Ноцицептивний біль (гострий або хронічний) опосередкований активацією больових рецепторів в шкірі, скелетно-м'язовій системі, зв'язках і вісцеральних органах. Традиційно ноцицептивний біль розглядається як наслідок активації нейрональних сенсорних (ноцицептивних) шляхів у відповідь на стимули від пошкодженої тканини. У процесі, відомому як трансдукція, пошкоджуючий стимул конвертується в потенціал дії периферичних ноцицепторних сенсорних волокон. Сигнал передається через периферичні нерви і спинний мозок до ГМ, де формується відчуття болю. Больовий досвід неможливий без трансмісії ушкоджуючого сигналу в мозок [167, 194, 213].

Ноцицептивний біль залучує до процесу різні нейрохімічні агенти та медіатори, включаючи ендорфіни, різноманітні біогенні аміни, ГАМК, нейрокініни, інтерлейкіни, простагландини та ін. Всі ці субстанції можуть розглядатися як цільові мішені для аналгетичної дії.

Ноцицептивний біль поділяється на соматичний та вісцеральний.

Соматогенні болі при РС пов'язані з порушенням м'язового тону, патологічними позами, неправильним руховим стереотипом, довготривалою іммобілізацією, а також з розвитком артрозів та остеопорозу [6, 287]. Ці болі, як правило, чітко локалізовані та зумовлені імпульсами з опорно-рухового апарату. До них відносяться болючі м'язові спазми, болі в суглобах кінцівок (7,5%), болі в спині (від 20-30% випадків в перші 5 років хвороби, до 83% при тривалості захворювання більше 15 років). Болі в суглобах зустрічаються набагато рідше, ніж м'язові болі. Частіше турбують болі в суглобах нижніх кінцівок (особливо в колінних), що співвідносяться з ознаками спастичного парезу в ногах. Найчастіше зустрічаються болі в спині. Показано, що ознаки остеохондрозу хребта у пацієнтів з РС з'являються достовірно раніше, ніж в групі порівняння. Це пов'язано з неврологічним дефіцитом, який прискорює дистрофічні процеси в хребті. Існує також теорія, що автоімунна агресія при РС направлена не тільки проти мієліну, але й проти кісткової, хрящової та

м'язової тканин [6]. Вісцерогенні болі виникають при активації ноцицепторів в стінках порожнинних органів при тазових розладах (закрепи, затримка сечі), внаслідок механічного розтягнення його стінок, запального процесу чи ішемії. Частіше всього проявляються болючими спазмами сечового міхура, що інколи супроводжуються сечовипусканням [312, 323].

Невропатичні (неврогенні) больові синдроми з'являються в разі залучення в патологічний процес периферичних або центральних структур, пов'язаних з проведенням ноцицептивних сигналів, тобто при пошкодженні структур біль-провідної системи [4, 6, 17]. РС в літературі описується як захворювання з центральним больовим синдромом.

В розвитку центрального больового синдрому можна виділити декілька основних механізмів, таких як центральна сенситизація, деаферентація, дизінгібіція, ектопічна активність.

Ураження соматосенсорної системи призводить до розгальмування і появи спонтанної активності деаферентованих центральних нейронів на спинальному і церебральному рівнях. В нормальних умовах сенсорні імпульси проходять шлях від периферичних тканин через ланцюг нейронів до СМ, стовбура і ГМ. Коли цей шлях переривається виникає феномен деаферентації. Він полягає в розгальмовуванні нейронів і посиленні передачі сигналів на верхні рівні ЦНС. Таким чином, нейрональна активність генерується не в пошкоджені нейроні, а в нейронах вищого порядку [30, 234].

Феномен центральної сенситизації характеризується тим, що після припинення впливу серії периферичних больових стимулів залишається певний рівень збудження в центральних сенсорних нейронах заднього рогу і такий стан зберігається протягом деякого часу автономно або підтримується дуже низьким рівнем ноцицептивної стимуляції. Це призводить до того, що надходження в задній ріг СМ слабких больових або не больових стимулів сприймається як біль. ЦС змінює характеристики вже наявного або

підпорогового соматогенного болю, спотворює і підвищує ступінь його інтенсивності, тривалості і просторової протяжності [30].

В основі центральної сенситизації лежить посилення активації NMDA-рецепторів. Встановлено, що основним нейротрансмітером, що використовується в болевідчувальних системах задніх рогів СМ є амінокислота глутамат, молекула якого може зв'язуватися з декількома різними класами рецепторів. Основну роль у токсичному ураженні нейронів, мієліну і, особливо, ОДЦ при РС грає глутамат, який утворюється у великих кількостях мозку під впливом прозапальних цитокінів (ІЛ1- β , ФНП- α) і енцефалітогенних Т-лімфоцитів, що індукують запалення в ЦНС при РС і ЭАЭ [20, 41, 45, 52, 58, 63, 65]. Показано, що у хворих на РС в період загострення і у тварин з ЕАЕ збільшується концентрація глутамату в лікворі, а також знижується активність ферментів, відповідальних за деградацію глутамату [1, 45, 61, 62). На постсинаптичній мембрані чутливих нейронів існує два типи глутаматних рецепторів. У сприйняття гострого болю найбільш залучені АМРА(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic-acid)-рецептори. У разі фізіологічного болю взаємодія глутамату з АМРА-рецепторами призводить до деполяризації мембран нейронів задніх рогів спинного мозку і формування при перевищенні порогу збудження потенціалу дії. При тривалій, повторюваній больовій стимуляції, яка забезпечує постійну і значну присутність глутамату в пресинаптичному просторі, в постсинаптичній мембрані відбувається активація іншого типу рецепторів, NMDA(N-methyl-D-aspartate)-рецепторів, що відбувається шляхом витіснення іонів магнію, котрі закривають їх натрієві і кальцієві канали. Підвищене виділення глутамату в пресинаптичний простір, тривала активність NMDA-рецепторів та інші нейрохімічні процеси сприяють гіперактивації, виснаженню і загибелі нейронів, формуючи вогнища (локуси) демієлінізації та дегенерації у різних відділах ЦНС. Активність системи NMDA-рецепторів і морфофункціональні зміни в периферичних нейронах і ЦНС, які значно прискорюються і посилюються при їх безпосередньому

ураженні (нейрогенних болях), ведуть до підвищення збудливості центральних ноцицептивних структур мозку - центральної сенситизації.

Блокада NMDA-рецепторів є одним з нових напрямків в лікуванні РС [29].

На сьогоднішній день існує велика кількість клінічних та експериментальних робіт, що свідчать про наявність у пошкодженому нерві аномальної ектопічної активності. При РС в пошкодженому аксоні натрієві канали присутні не лише в перехватах Ранв'є, а по всій його довжині, що є передумовою виникнення спонтанної активності [163]. Ці локуси ненормальної активності отримали назву ектопічних нейрональних пейсмейкерних місць, що володіють ланцюговою активністю. Джерелом ектопічної активності є зони демієлінізації та регенерації нерва [40].

Ектопічна активність істотним чином відрізняється від патернів нормальних розрядів. Якщо в нормальних умовах тривалість розряду обмежена тривалістю стимулу, то ектопічний розряд має не тільки збільшену амплітуду сигналу, але і більшу тривалість. В результаті чого розряд, що виник в одному волокні, може активувати інші волокна. Подібне перехресне збудження волокон або ефаптична передача сигналу спостерігається тільки в умовах патології і є основою для виникнення дизестезії та гіперпатії.

Органічне ураження ГМ та/або СМ може призводити до порушення функцій низхідних антиноцицептивних систем мозку, зменшуючи толерантність до сенсорних (больових) периферичних стимулів. Механізм дефіциту модулюючих біль антиноцицептивних впливів називають дезінгібіцією [30, 184].

В останні роки отримано багато нових даних про можливу роль нейротрофічних факторів, мікроглії, цитокінів у патогенезі розвитку нейропатичного болю. Показано, що пошкодження нерва призводить до гіпертрофії і активації гліальних клітин, включаючи мікроглію, в сірій речовині СМ. Мікроглія експресує пуринергічні рецептори, які активуються АТФ. Після активації мікроглія вивільняє різні проноцицептивні цитокіни,

наприклад ІЛ-1, ФНП- α і нейротропіни, включаючи нейротропний фактор мозкового походження, які у свою чергу підсилюють ноцицептивну передачу і сприяють сенсibiliзації та підтриманню нейропатичного болю [55].

У розвитку кожного больового симптому приймає участь певна комбінація механізмів, що є також характерним для РС. Тобто в розвитку центрального больового синдрому бере участь не один певний механізм, а спостерігається їх взаємодія. Підтвердженням даної концепції можна також вважати уявлення Р. Н. Крижановського (1980, 1997) про те, що структурною основою нейрогенних больових синдромів, є агрегат взаємодіючих сенситизованих нейронів з порушеними гальмівними механізмами і підвищеною збудливістю. Такі агрегати здатні розвивати тривалу самопідтримуючу патологічну активність, для якої не обов'язкова аферентна стимуляція з периферії. Агрегати нейронів з патологічною активністю можуть виникати внаслідок деаферентації структур, що здійснюють проведення та обробку ноцицептивних сигналів на різних рівнях СМ і ГМ. Важливе значення в механізмах утворення агрегатів гіперактивних нейронів у структурах ЦНС відводиться придушенню гальмівних реакцій, які опосередковуються гліцином і ГАМК [66, 67].

Якщо раніше РС сприймали лише як демієлінізуюче захворювання ЦНС, а ураження периферичної нервової системи завдавали аргументом проти наявності РС, то в теперішньому РС слід розглядати як демієлінізуюче захворювання ЦНС, асоційоване з патологією периферичної нервової системи (радикулопатії, моно - і полінейропатії). На цю обставину, зокрема, вказують Couratier P. et al. (2004) [108]. Внаслідок переключення автоімунних реакцій з компонентів мієліну ЦНС на мієлін периферичної нервової системи спостерігається полінейропатичний синдром з характерними розладами чутливості [69]. Тому таким чином до розвитку больового синдрому при РС можна додати периферичні механізми: пряма стимуляція нейронів, генерація спонтанної больової імпульсації з ектопічних вогнищ, що формуються при регенерації пошкоджених волокон, ефаптичне

поширення нервових імпульсів між демієлінізованими нервовими волокнами, підвищена чутливість невром пошкоджених сенсорних нервів до норадреналіну і деяких хімічних агентів, периферична сенситизація.

Таким чином, в основі розвитку нейрогенних больових синдромів лежать структурно-функціональні зміни, що зачіпають периферичні і центральні відділи системи больової чутливості. Під впливом пошкоджуючих факторів виникає дефіцит гальмівних реакцій, що приводить до розвитку в первинному ноцицептному реле агрегатів гіперактивних нейронів, що продукують потужний аферентний потік імпульсів, які сенситизують супраспінальні ноцицептивні центри, дезінтегрують нормальну роботу і залучають їх до патологічної реакції. Пластичні зміни, що відбуваються при цьому об'єднують гіперактивовані ноцицептивні структури в нову патодинамічну організацію — патологічну алгічну систему, результатом діяльності якої є больовий синдром.

Невропатичний біль, в свою чергу, поділяється на дизестезичний та трункальний [20]. При РС поверхневий дисестезичний чи деаферентаційний біль описується пацієнтами, як пекучий, колючий, такий що викликає відчуття опіку, свербіння, повзання мурашок, стягнутості, проходження електричного струму різної тривалості. Дисестезичні болі звичайно спостерігаються в пацієнтів з переважним втягненням в процес малих С-волокон (вражається поверхнева больова, температурна чутливість, розвивається вегетативна дисфункція). Глибокий трункальний біль характеризується як ниючий, часом різжучий. До цього ж типу можна віднести і м'язовий біль, що проявляється судомами, тягнучо-давлячими відчуттями та болючістю м'язів при пальпації. Вони звичайно довготривалі та можуть змінювати інтенсивність. Трункальний біль зустрічається при компресії спинномозгових корінців, тунельних невропатіях, і пов'язаний з дисфункцією АД-волокон [4, 6, 8, 70].

Зміни глибокої та поверхневої чутливості відносяться до найбільш частих симптомів РС і спостерігаються у 77% хворих [61]. В багатьох випадках РС починається з алгічних та парестезичних феноменів [298, 330].

Серед гострих невропатичних болей, без сумнівів, найбільш яскравим прикладом є невралгія трійчастого нерва, яка зустрічається серед хворих на РС в 300 разів частіше, ніж в популяції [317]. На відміну від її ідіопатичної форми, невралгія трійчастого нерва при РС частіше носить білатеральний характер і може супроводжуватися зниженням чутливості в зоні інервації нерва, тобто протікати по типу тригемінальної невропатії [108]. Але частіше проявляється різжучими болями в області обличчя, що виникають від найменших рухів м'язів обличчя (при зіванні, жувальних рухах, чханні чи при умиванні). В більшості людей раптові приступи можуть виникати при дотиках, під час жування чи навіть чищення зубів. Дослідження МРТ показали, що тригемінальна невралгія може бути зумовлена наявністю вогнища демієлінізації в зоні входження корінця трійчастого нерва в стовбур ГМ [332].

Гострі корінцеві болі в кінцівках можуть бути присутніми в 13% хворих на РС. Їх зв'язок з РС доказується знаходженням вогнищ демієлінізації на рівні інтрамедулярної порції заднього корінця спино-мозкового нерва в СМ, а також відсутністю ознак компресії корінця. Локалізація вогнища в латеральному канатику шийного відділу СМ викликає фантомний біль у верхніх кінцівках [209].

Тонічні м'язові спазми у хворих на РС вперше описані W.B.Mattews в 1958 році. Болі в м'язах можуть бути як короткочасними так і довготривалими, мати стягуючий, ниючий, стискаючий характер, бути як односторонніми так і двохсторонніми [6, 215]. Довготривалі хронічні болі, як правило з'являються на нижніх кінцівках. Вони не такі інтенсивні, але ниючі, частіше пов'язані з м'язовою втомою. Короткочасні м'язові болі мають вигляд болючих тонічних спазмів та судом, виникають на верхніх та нижніх кінцівках, частіше виникають вночі, гострі, дуже інтенсивні, можуть спровокуватися звичайним тактильним подразником. Дослідження з допомогою МРТ показали, що тонічні спазми можуть бути зумовлені ураженням кортикоспінальних шляхів на будь-якому рівні нижче кори [6,

217], зокрема описані кореляція з пошкодженням СМ [215], середнього мозку, ніжок мозку [273], внутрішньої капсули [220], таламуса [218] та базальних гангліїв [65]. Білатеральна симптоматика зазвичай свідчить про спинальний рівень ураження, односторонній процес із залученням обличчя свідчить про процес в базальних гангліях. Описані випадки, коли тонічні спазми були першими симптомами РС, інколи виникали за чи більше років до розгорнутої клінічної картини захворювання. В результаті багаточисленних дослідів було показано, що причиною тонічних м'язових спазмів є одностороннє ураження рухових шляхів на рівні задньої ніжки внутрішньої капсули або в області ніжки мозку при збереженості нижчих відділів пірамідних трактів.

Особливості мембран сенсорних нейронів визначають їх більш високу чутливість до демієлінізації в порівнянні з моторними, що проявляється порушенням чутливості, а симптом Лерміта виникає при підвищеній чутливості демієлінізованих нервових волокон до механічних подразників. Його розглядають як маркер активного перебігу захворювання з ураженням задніх канатиків СМ та шийних корінців [33, 67]. Він проявляється відчуттям проходження електричного струму зверху вниз вздовж хребта при згинанні шиї та спостерігається у до 25% хворих [6, 62, 64].

Хронічні больові синдроми в клініці РС виникають у 50-60% випадків. Причини їх проявів та характер болю бувають різними [4, 6]. Так, біль при ретробульбарному невриті пояснюється подразненням твердої мозкової оболонки та набряком навколишніх тканин [303].

Серед можливих механізмів патогенезу цефалгій мають значення ліквородинамічні порушення, судинний фактор, напруження м'язів шиї [253]. На ранніх стадіях РС часто проявляється асиметричними і мозаїчними розладами вібраційної та больової чутливості [312]. Пацієнти при цьому скаржаться на оніміння, «замороженість», відчуття «повзання мурашок», поколювання, печіння, переважно в долонях і стопах [198].

Особливу групу складають психогенні болі, які з'являються незалежно від ноцептивних чи нейрональних пошкоджень і в більшій мірі визначаються психологічними та соціальними факторами. Психогенні болі в чистому вигляді зустрічаються рідко. Вони розвиваються на фоні депресії чи тривожного стану при великій тривалості хвороби та пов'язані зі зниженням больової толерантності [65, 95]. До таких болей в першу чергу можна віднести головні болі напруги.

1.3. Сучасна стратегія фармакотерапії розсіяного склерозу

Як уже наголошувалося, РС є автоімунним демієлінізуючим захворюванням причини виникнення якого залишаються невідомими. За даних умов етіотропне лікування стає неможливим. Тому дія основної кількості препаратів, що застосовуються для лікування РС, спрямована на основні ланки патогенезу. Так, як РС на сучасному етапі є медико-соціальною проблемою, тому терапія включатиме в себе не лише медикаментозні програми, але також й нейрореабілітацію, якій в останні роки надається велика кількість уваги [62], тобто лікування матиме комплексний характер.

В даний час лікування РС проводиться за такими основними напрямками: патогенетична терапія, симптоматична терапія, фізіотерапевтичне лікування, фізична й психологічна реабілітація.

Патогенетичне лікування в основному залежить від типу хвороби, вираженості неврологічних симптомів та активності процесу (ремісія чи загострення), що клінічно та інструментально підтверджено. Основними завданнями цього напрямку є лікування загострень захворювання та максимальне подовження періодів ремісії.

Основним методом лікування розсіяного склерозу в період загострення є призначення КС. Більшість загострень збігається за часом з утворенням нових активних вогнищ демієлінізації, що виявляються при МРТ-дослідженні в ГМ і СМ, що свідчить про нову хвилю запалення.

Застосування високих доз глюкокортикоїдів прискорює їх зникнення. Проте після припинення гормональної терапії може спостерігатися новий спалах активності хвороби, що також відображають дані МРТ. Це може бути пов'язано зі швидкістю відміни гормонів, тому найбільш оптимальним є проведення "пульс-терапії" з використанням високих доз КС— 1000 мг і вище, що вводяться внутрішньовенно, одноразово на добу, протягом 3 – 5 днів [45], і подальшим переходом на пероральний прийом кортикостероїдів протягом декількох днів, з поступовим зниженням дози.

При лікуванні загострень РС використовуються препарати з мінімальним мінералокортикоїдним ефектом, такі як метилпреднізолон і солумедрол [29].

Тривале застосування невеликих доз КС при лікуванні РС протипоказано через високий ризик виникнення побічних ефектів: остеопорозу, асептичного некрозу кісток, артеріальної гіпертензії, гіперглікемії, катаракти, психозу та ін. [276].

При цьому ефективність сприятливого впливу малих доз КС на перебіг РС – сумнівна.

Метилпреднізолон при використанні його в лікуванні РС чинить імуносупресивну дію на імунну систему за рахунок сповільнення активації і проліферації Т-лімфоцитів, активації апоптозу Т-лімфоцитів, зниження продукції антитіл.

Важливим ефектом метилпреднізолону в лікуванні РС є його вплив на ГЕБ, який полягає в зниженні його проникності. Зниження проникності ГЕБ досягається за рахунок блокади молекул адгезії і зниження рівня матричних металопротеаз. Саме підвищення проникності ГЕБ, пов'язане із запальними змінами в ЦНС при РС, є одним з перших етапів формування нових вогнищ демієлінізації.

Пульс-терапію КС застосовують при загостренні РС середнього й тяжкого ступеня. У разі легких загострень лікування КС не проводиться [312].

У хворих з атаками РС, що не піддаються впливу КС-терапії, можливе застосування аферентних методів (гемосорбція, плазмасорбція, плазмаферез, ентеросорбція), цитостатичних препаратів, людського імуноглобуліну для внутрішньовенного введення. Можлива одночасна комбінація з декількох засобів. У хворих з ремітуючою формою РС плазмаферез у комбінації з АКТГ і циклофосфамідом прискорював відновлення [85].

У зв'язку з тим, що атрофія ГМ і СМ починається на ранній стадії РС (ще до постановки достовірного діагнозу), найважливішим напрямком у лікуванні захворювання на сучасному етапі є раннє застосування імуномодельючої терапії, що попереджує розвиток загострень і прогресування патологічного процесу. Вплив на початкову ланку патологічних реакцій може змінити і зупинити весь подальший розвиток хвороби [63-65].

В даний час використовується два класи препаратів 1-го вибору, які довели в міжнародних широкомасштабних контрольованих клінічних дослідженнях свою високу ефективність щодо зменшення частоти загострень та уповільнення прогресування захворювання при РС [18, 67-71, 88]: препарати 1-го класу - β -інтерферони 1a і 1b (препарати авонекс, бетаферон, ребіф) та 2-го класу - глатирамера ацетат (препарат копаксон).

Станом на серпень 2006 р. в Україні зареєстровані та дозволені до застосування при РС препарати бетаферон (інтерферон бета-1b), копаксон (глатирамера ацетат) та ребіф (інтерферон бета-1a) [45].

Всі три зареєстрованих препарата довели свою ефективність і схвалені для застосування при рецидивуючо-ремітуючій формі РС, а бетаферон — також і при вторинно-прогресуючій формі РС, і після першого клінічно ізольованого синдрому. Однак механізми дії β -інтерферонів та глатирамера ацетату різні.

Представляється, що інтерферони бета діють як цитокіни на периферії, де пригнічують активацію лімфоцитів. Механізми корисних ефектів β -інтерферону при РС ще знаходяться на стадії вивчення, основними з них є

пригнічення продукції ІФН- γ і ТНГ- α , зменшення їх прозапального імунологічної відповіді, зменшення презентації антигену і проліферації лімфоцитів, зниження міграції запальних клітин через ГЕБ в ЦНС (блокада матриксної металопротеази і молекул адгезії), грають невелику роль в індукуванні апоптозу запальних клітин.

Противірусна дія b-інтерферону навряд чи впливає на результати при РС, оскільки ще не виявлений вірус РС.

ГА являє собою суміш синтетичних пептидів, які за амінокислотним складом подібні до будови основним білка мієліну. Він разом з протеїнами ГКГ II класу експресується антигенпрезентуючими клітинами на їх поверхні. Т-лімфоцити, рецептори яких розпізнають пептиди ГА, пов'язані з ГКГ II класу, взаємодіють з антигенпрезентуючими клітинами і активуються для клональної проліферації [303]. Ці клони ГА-специфічних Т-лімфоцитів являють собою Т-клітини фенотипу Th2, які можуть виділяти протизапальні цитокіни. Передбачається, що ГА-специфічні Th2-лімфоцити проникають у ЦНС, де виділяють протизапальні цитокіни *in situ*. Таким чином, вони можуть знижувати запальну активність — феномен, званий «захист очевидцем» [230]. Міграція ГА-специфічних Th2-клітин вогнища запалення в ЦНС продемонстрована на моделях РС у тварин. Крім того, ГА-специфічні Т-лімфоцити секретують мозковий нейротрофічний фактор в бляшках РС, що може сприяти нейропротекції [235].

Таким чином, ці групи препаратів мають зовсім різні механізми дії та точки прикладення. Можна виявити і спільні чи схожі ефекти, але вони не є основними.

За даними ВООЗ за 2003 рік, через 1 рік від початку лікування імунomodуляторами 45% хворих перестають дотримуватися режиму лікування. Основними причинами цього є неефективність терапії і побічні ефекти препаратів [8]. Так клінічна ефективність тривалого застосування бетаферона не перевищує 25%, а копаксона — 40% [28].

Оскільки ефективність імуномодуляторів (Інтерферони β , Копаксон) в лікуванні РС – обмежена, а частота і серйозність, пов'язаних з використанням цих препаратів ускладнень, досить велика – необхідний пошук нових методів лікування РС [17, 27, 55, 65, 85, 88, 159].

Група імуномодуляторів при РС набагато ширша (мітоксантрон, наталізумаб), але при їх застосуванні зареєстровано виражений побічний ефект, за рахунок чого препарати використовуються як засоби 2-го покоління, при неефективності або наявності протипоказань до наведених вище.

Розуміючи відмінності в механізмах дії різних груп імуномодуляторів, слід вибирати терапію індивідуально, відповідно до статусу пацієнта, стадії захворювання, переносимості терапії і т. д. [67-71].

Патогенетичним впливом при РС також вважається застосування нейропротекції: як в період ремісії, так і загострення.

Сьогодні великі надії покладаються на аутологічну трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин (АТСК) при РС [164, 232]. Оптимальним клітинним матеріалом для терапії РС на сьогоднішній день є аутологічні ГСК периферичної крові. Введення пацієнту з РС після ВІСТ власних стовбурових клітин повинно повністю відновити клітинний імунітет, гіпотетично позбавлений патологічної пам'яті, і тим самим спробувати придушити РС. Однак імунологічні дані свідчать про наявність високого запального потенціалу в сироватці крові та накопиченні клону аутореактивних лімфоцитів, які «готуються до вторгнення» в ЦНС, що може в перспективі призвести до загострення РС і свідчить про те, що повне одужання при використанні даного методу, швидше за все, неможливо. Справжню ефективність і недоліки методу можна буде оцінити тільки через десятки років [67].

Адекватне і якісне симптоматичне лікування РС є не менш важливим завданням, ніж патогенетичне лікування РС. Під симптоматичним лікуванням розуміють всі способи лікування, які сприяють зняттю або

пом'якшення симптомів хвороби і наступних станів, обумовлених хворобою, але не усувають її причини.

Основними напрямками симптоматичного лікування РС є [6, 110] зменшення вираженості залишкових неврологічних симптомів при різних типах перебігу РС або повна компенсація цих симптомів, тобто зниження ступеня інвалідизації, попередження ускладнень (пролежні, вторинні інфекції, утворення контрактур, вегетативно-трофічних порушень), максимально довге збереження здатності хворого до професійної діяльності та самообслуговування у побуті, до соціальної активності, звичного способу життя [77, 85].

Медикаментозне симптоматичне лікування РС призначається при виявленні у хворого неврологічних або інших симптомів, що надають значущий негативний вплив на стан хворого і помітно знижують якість життя.

Реабілітаційний медико-соціальний процес є важливою складовою терапевтичної допомоги пацієнтам з РС.

Реабілітація — це система медичних, психологічних, педагогічних, соціально-економічних заходів, спрямованих на усунення або як можна більш повну компенсацію обмежень життєдіяльності, викликаних порушенням здоров'я зі стійким розладом функцій організму. Вона спрямована на корекцію нейропсихологічного стану хворих, участі їх у повсякденному житті і виробничій діяльності. Хворим рекомендується зберігати максимальну активність у всіх видах діяльності [43].

Основними принципами реабілітаційного процесу (РП) є безперервність та комплексність.

У сфері реабілітації інвалідів з неврологічними порушеннями представляється доцільним розбити РП на великі пули реабілітаційних заходів, що охоплюють основні аспекти життєдіяльності людей з обмеженими можливостями: психосоціальна реабілітація, медична

реабілітація, соціально-побутова реабілітація, професійна реабілітація, цивільно-правова реабілітація [43, 58, 61].

Проведення перерахованих видів реабілітаційних заходів у паралельних або послідовних комбінаціях є основою для ефективного проведення реабілітаційних заходів. При цьому необхідно враховувати перебіг і форму РС. Для позитивного ефекту нейрореабілітації необхідна активна участь самого хворого, що буває досить важко зробити через виражений неврологічний дефіцит, а часом і депресивний стан хворого. З ПП тісно пов'язані питання етики і деонтології.

1.4. Особливості нейропротекції при розсіяному склерозі

Концепція нейропротекції набуває останнім часом все більшого значення. Комплексні дослідження в цій області спрямовані на розробку методів, що попереджають ушкодження і загибель нервових клітин, що зумовлені гіпоксією, ішемією, травмою, токсичними впливами, нейродегенеративними процесами. Зараз вже відома структура механізмів, що призводять до загибелі нервових клітин. Цими механізмами є: ексайтотоксичність — пошкоджуюча дія на нейрони підвищених концентрацій збуджуючих амінокислот (глутамату, аспартату); окислювальний стрес — пошкодження мембран нейронів токсичними вільними кисневими радикалами та продуктами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ); мітохондріальна дисфункція; гіперекспресія ранніх генів; дефіцит нейротрофічних факторів, що ініціюють нейроапоптоз [21].

Нейропротекція представляється зараз як новий універсальний терапевтичний підхід в регуляції балансу імунних і нейротрофічних факторів у різних формах нейрональних розладів [331]. Тому в якості основних напрямків нейропротекції з точки зору конкретного терапевтичного впливу на основні механізми клітинної загибелі обговорюються наступні: протидія глутаматній ексайтотоксичності і вільнорадикальному окисленню —

застосування оборотних блокаторів NMDA- рецепторів і антиоксидантів, гальмування апоптозу нейронів і ОДЦ – використання інгібіторів каспаз, трофічних факторів, інгібування запалення – призначення протизапальних препаратів [163, 164].

Нейропротекція включає в себе велику кількість препаратів різних груп та з відмінними механізмами дії.

Глутаматні рецептори поділяються на іонотропні та метаботропні (mGluR 1-8). Іонотропними рецепторами являються NMDA-рецептори, AMPA-рецептори та кайнатні рецептори [1]. Як відомо на нейронах експресуються рецептори NMDA і GluR1 AMPA-типу, на ОДЦ – тільки GluR1 AMPA-рецептори [1, 277, 316], а на клітинах, що формують ГЕБ – в основному рецептори NMDA-типу [1, 303]. Гіперактивація іонотропних рецепторів глутамату, що відбувається при надмірному утворенні збуджуючих амінокислот призводить до входу Ca^{2+} в клітину. Його висока концентрація в цитоплазмі запускає нейротоксичні процеси, що включають роз'єднання мітохондріального транспортного ланцюга, активацію ряду ферментів (калпаїн, матриксні металопротеїнази), що викликають деструкцію цитоскелету нейронів. Важливу роль в індукції запалення при РС і ЕАЕ відіграє підвищення проникності ГЕБ для енцефалітогенних Т-лімфоцитів і цитокінів, викликане активацією NMDA-рецепторів у клітинах, що формують ГЕБ, під дією ендогенного глутамату та поліамінів [1, 2, 222]. Тому застосування блокаторів глутаматних рецепторів має виражений позитивний ефект при лікуванні хворих з РС.

Досить обґрунтованим на даний момент є застосування амантадину (ПК-мерц). Завдяки блокуванню глутаматних рецепторів захищає ОДЦ і нейрони від ушкодження [273], пригнічує розвиток ЕАЕ, а також знижує патологічну м'язову стомлюваність при РС. В даний час широко обговорюється проблема інгібування оборотними блокаторами глутаматних рецепторів пресинаптичного вивільнення глутамату в якості основного

нейропротекторного підходу в клініці ішемічних і нейродегенеративних розладів мозку [55, 164].

Також обговорюється застосування для лікування РС комбінованих блокаторів NMDA-рецепторів та GluR1AMPA-рецепторів. Селективні NMDA-блокатори, до яких умовно можна віднести амантадин, лише частково зменшують токсичну дію глутамату на мотонейрони та аксони, що викликано особливістю розташування рецепторів, також NMDA-блокатори не здатні послабити викликану глутаматом дегенерацію мієлінопродукуючих клітин – ОДЦ, тому що на них розташовані виключно GluR1AMPA-рецептори. Однак AMPA-блокатори не здатні знижувати проникність ГЕБ та пригнічувати запалення в ЦНС [220]. Мабуть, тому AMPA-блокатори практично не збільшують латентний період ЕАЕ у щурів. В дослідях на ЕАЕ комбіноване застосування NMDA-блокаторів та блокаторів GluR1AMPA-рецепторів показало найбільш високу протективну активність, що пов'язано з нейропротективною і протизапальною дією, обумовленою, з одного боку, комбінованою блокадою GluR1 AMPA та NMDA-рецепторів мозку, а з іншого боку – зменшенням проникності ГЕБ для енцефалітогенних Т-лімфоцитів внаслідок блокади NMDA-рецепторів в ГЕБ [1, 2, 268].

Добре вивчена роль окислювального стресу та зниження активності антиоксидантного захисту в патогенезі розсіяного РС. Вільні радикали, які у великій кількості утворюються у вогнищах аутоімунного запалення активованими макрофагами і мікроглією, призводять до пошкодження клітинних мембран і ДНК ОДЦ та нейронів з розвитком демієлінізації і руйнуванням аксонів [28]. У фізіологічних умовах шкідливу дію вільних радикалів стримують ендогенні речовини, такі як каталаза, глутатіонпероксидаза, супероксиддисмутаза, вітамін Е, відновлений глутатіон. Підвищена чутливість нейронів ГМ до окислювального стресу може бути наслідком низького вмісту ферментів антиоксидантного захисту, високого рівня поліненасичених жирних кислот, іонів двовалентного заліза, що вивільняються при пошкодженні клітин. У хворих на РС виявляють

істотне зниження вмісту і активності чинників антиоксидантного захисту та явні ознаки окисного стресу [60, 69, 85]. Це є передумовою для цілеспрямованого використання ліпотропних і антиоксидантних препаратів в комплексному лікуванні розсіяного склерозу.

Із препаратів цього напрямку доцільно назвати такі: токофероли і каротиноїди, які інактивують атомарний кисень; супероксиддисмутазу (каталізує перетворення атомарного кисню в молекулярний); каталазу, глутатіон, церулоплазмін (природні антиоксиданти), лазароїди, хелати заліза (зменшують продукцію монооксиду азоту й пероксинітриту), фенілтретбутилнітрон (зв'язує вільні радикали), мексидол, який гальмує перекисне окислення ліпідів, нормалізує рецепторну і транспортну функцію клітинної мембрани нейронів; цитофлавін, що відновлює активність ферментів антиоксидантного захисту.

α -ліпон – в якості кофактора регенерує в окисно-відновних реакціях α -токоферол, аскорбінову кислоту, збільшує внутрішньоклітинний пул глутатіону, володіє антирадикальною дією – видаляє активні гідроксильні радикали, гіпохлорну кислоту, оксид азоту, пероксинітрит, перекис водню та атомарний кисень, гальмує синтез прозапальних цитокінів. Ліпоєва кислота здатна інгібувати молекули адгезії і проявляє виражені антиоксидантні властивості, що обумовлено наявністю в її структурі тіолових (-SH) груп. Включення в антиоксидантний комплекс ліпоєвої кислоти при лікуванні хворих на РС засновано, крім того, на її здатності легко долати ГЕБ, що дозволяє здійснювати нейропротекцію в ЦНС [32]. Доведена більш висока ефективність при комбінованому застосуванні α -ліпоєвої кислоти з комплексом вітамінів групи В. Терапія комбінацією α -ліпоєвої кислоти та вітамінів групи В має більш виразний позитивний вплив на динаміку когнітивних функцій пацієнтів з РС, ніж монотерапія вітамінами групи В [188].

α -токоферол, β -каротин, аскорбінова кислота і селен, що містяться в триовіті, видаляють супероксид-радикал і потенціюють антиоксидантні

ефекти α -ліпоєвої кислоти. Самий широко і тривало застосовуваний комплекс антиоксидантів [230, 291].

Цитофлавін – включає бурштинову кислоту, рибоксин, рибофлавін. Завдяки своїм компонентам, препарат впливає на більшість ланок циклу Кребса, тим самим покращуючи енергозабезпечення клітини, має антигіпоксичну та антиоксидантну дію, активізує внутрішньоклітинний синтез білка і нуклеїнових кислот, ферментативні процеси, сприяє утилізації глюкози, синтезу та внутрішньоклітинного накопичення АТФ та інших макроергів [162]. Експериментально доведено, що застосування цитофлавіна в комплексі з базисною і КС-терапією в процесі призупинення загострення РС викликає більш значний регрес неврологічного дефіциту. Призначення цитофлавіна посилює ефективність базисної (трентал і вітаміни групи В) терапії, що зменшує необхідність у призначенні КС при лікуванні загострень РС [160].

Нейротрофічні фактори – сімейство білків, необхідних для розвитку ЦНС. Вони підтримують виживання нейронів, зростання аксонів і дендритів, впливають на проліферацію і диференціювання ОДГ, сприяють мієлінізації та ремієлінізації, регулюють експресію нейромедіаторів і вираженість апоптозу. Багато нейротрофічні фактори впливають на різні функції імунних клітин – міграцію, активацію, диференціювання і представлення антигенів [52, 55]. Дослідження показали, що у пацієнтів з РС концентрація нейротрофічного фактору мозку (BDNF) в сироватці крові значно нижче контрольного значення, що вказує на недостатність механізмів, що протистоять мозковому пошкодженню при цьому захворюванні. Асоціація цього показника з деякими клінічними проявами РС, такими як втомлюваність і депресія, підтверджує участь недостатності нейротрофічних процесів в патогенезі захворювання [196].

В даний час єдиним препаратом, що складається зі збалансованої за складом суміші активних фрагментів нейротрофічних факторів, є церебrolізін. Фармакологічна дія церебrolізіну (ендогенна нейротрофіка,

нейропротекція та нейропластичність) ідентичні механізмам природних репаративних процесів, які протікають в організмі, що визначає його плейотропний ефект [213].

Представляючи собою гідролізат тканини мозку, церебролізін містить амінокислоти, пептиди, і ростові чинники, які передбачають здатність препарату стимулювати ремієлінізацію [62]. Вивчення механізмів дії церебролізіну показало, що кожен з пептидів препарату виконує специфічні — трофічну і модуляторну — функції: одні пептиди володіють самостійними нейротрофічними властивостями, інші індукують синтез ендогенного фактора росту нервів в астроцитах. Дослідження на культурі нервових клітин дозволили зробити висновок про те, що церебролізін сприяє функціональному дозріванню нейрональної мережі за рахунок гальмування апоптозу [291]. Поряд з цим пептиди церебролізіну активно взаємодіють з нейротрансмітерними системами, підвищуючи функціональну взаємодію нейронів і клітин глії, покращуючи синаптичну передачу і пластичність тканини мозку. Нейротрофічні ефекти препарату обумовлюють підвищене виживання клітин мозку в умовах припинення їх нейротрофічної підтримки з боку клітин-мішеней. На клітинному рівні нейропротективний ефект церебролізіну пов'язаний із запобіганням пошкодження дендритів. Крім цього, церебролізін покращує транспорт глюкози через ГЕБ, виявляючи, таким чином, мультимодальну дію, спрямовану на цілий ряд ключових механізмів процесу нейродегенерації [332]. Крім того, встановлений антиоксидантний ефект при дії церебролізіну у вигляді підвищення активності каталази і супероксиддисмутази у щурів з пошкодженням гіпокампу [162, 163].

Зважаючи на те, що запалення в даний час представляється як складний послідовний каскад реакцій, для кожної окремої ланки запального процесу при лікуванні РС розглядається своя найбільш ймовірна терапія [284]. Для зменшення проникнення Т-лімфоцитів через ГЕБ та зниження активації молекул адгезії використовують антагоністи хемокінових рецепторів,

інгібітори ММП, при порушенні аксон-гліальної взаємодії виправданим буде застосування нейротрофічних факторів, для зменшення вмісту макрофагів/мікрогліоцитів та їх продуктів (запальних цитокінів, включаючи ФНПа), які особливо активні в період загострення, застосовують КС, ІФН- β , інгібітори фосфодіестерази, блокатори ФНП-рецепторів, при збільшення NO, Ca-опосередкованому ушкодженні аксолеми, активація Na-каналів, що характерно для окисного стресу, використовують інгібітори NO-синтетази, інгібітори фосфодіестерази, антагоністи Ca, естроген, прогестерон, канабіноїди, імунофіліни (циклоспорин), блокатори Na-каналів, для зменшення T α 1- імуноопосередкованої відповіді та CD8- цитотоксичності – ІФН- β , копаксон, антитіла до CD8 [158, 162].

Як протизапальний та імуномодуючий засіб широко застосовується у комплексі лікування РС трентал. Трентал покращує реологічні властивості крові, пригнічує тромбоутворення та нормалізує мікроциркуляцію і знижує рівень ФНП- α . В ході дослідження виявлено зниження рівня прозапальних та збільшення протизапальних цитокінів, зменшення тривалості загострення, запаморочення, атаксії, чутливих розладів [31]. Також за допомогою УЗДГ і МС виявлено покращання кровотоку по мозковим артеріям. Це, ймовірно, також сприяло клінічному поліпшенню за рахунок поліпшення мозкової гемодинаміки, оксигенації мозку, метаболізму в тканині мозку і прискорення репаративних процесів. У зв'язку з цим цілком обґрунтовано призначення тренталу при лікуванні запальних і демієлінізуючих захворювань, зокрема при РС [65, 70, 71].

Є докази, які свідчать, що запалення також може відігравати позитивну роль у нейропротекції і нейропластичності. В експериментах *in vitro* та *in vivo* виявлено, що макрофаги можуть надавати стимулюючий вплив на фактори росту при їх недостатності в ЦНС [65]. Більш того, в експериментах на тваринах з моделями демієлінізації в ЦНС був показаний кореляційний зв'язок між кількістю макрофагів і процесами ремієлінізації [66].

Макрофаги, крім прозапальних цитокінів, секретують також і фактори росту (IGF-1, TGF- β 1) та інші цитокіни, прямо або опосередковано посилюють проліферацію, диференціацію та міграцію клітинних попередників. При РС активація астроцитів індукує диференціацію попередників ОДЦ [169, 196, 203].

Нейропротекцію при РС умовно можна поділити на первинну, вторинну та репаративну. Первинна нейропротекція призначається при загостреннях РС. Вона включає в себе протизапальну (трентал), нейротрофічну (церебrolізін), антиглутаматну (ПК-мерц) та антиоксидантну (еспа-ліпон, ацетилцистеїн, тріовіт, нейромультівит) терапію. На цьому етапі захворювання нейропротективну терапію проводять якомога раніше після початку загострення, найбільш активно і, як правило, в стаціонарі. Вторинну нейропротекцію призначають після купірування гострого запалення з метою профілактики повторних загострень у стадії ремісії РС 2-4 рази в рік. Репаративну терапію призначають поза загостреннями РС з метою ремієлінізації та відновлення функції нейронів і гліальних клітин, що знаходяться в стадії апоптозу. Препаратами вибору є людські імуноглобуліни для внутрішньовенного введення (найбільш активний з них - пентаглобін) і нейротрофічні препарати (церебrolізін, лецитин і нейромультівит) [162, 163].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дисертаційній роботі представлені результати порівняльного аналізу особливостей спектру фармакологічної активності ряду неопіоїдних та ад'ювантних анальгетиків і засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу, а також проведена оцінка їх антиноцицептивного та нейропротективного потенціалу відповідно при сумісному застосуванні з представником засобів базової гормональної терапії – метилпреднізолоном при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ).

2.1. Об'єкт та предмети дослідження

Об'єкт дослідження: больовий і невропатичний синдром та когнітивна дисфункція за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу.

Предмет дослідження: усунення болю шляхом застосування ряду неопіоїдних і ад'ювантних анальгетиків та корекція когнітивних і нейродегенеративних порушень засобами нейропротективно-антиоксидантного комплексу при ЕАЕ.

2.1.1. Характеристика лабораторних тварин, залучених до експериментальних досліджень

Експериментальні дослідження проведені на 518 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 210-300 г з відтвореним в експерименті еквівалентом розсіяного склерозу.

Тварини знаходилися на стандартному раціоні та в стандартних умовах віварію ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (температура повітря: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, світлий/темний цикл: 12/12 годин) відповідно до санітарно-гігієнічних норм та отримували їжу та пиття *ad libitum* [192].

Усі дослідни проводили відповідно до методик і вимог ДФЦ МОЗ України [91, 106, 192], правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» (м. Страсбург, 1986) [251] та «Положення про використання тварин в біомедичних дослідках» [72]. Протоколи експериментальних досліджень та їх результати затверджені рішенням комісії з біоетики Дніпропетровської державної медичної академії (протокол №2 від 06.02.2017 р.).

2.1.2. Характеристика лікарських засобів, які використані в дослідженні

Усі використані у процесі проведення експериментальних досліджень лікарські засоби вводили інтрагастрально один раз на добу одноразово (неопіодні анальгетики, антиконвульсанти та антидепресанти) або протягом 14 діб (засоби нейропротективно-антиоксидантного комплексу). Для отримання однорідної суспензії для внутрішньошлункового введення таблетованих форм використаний розчин Твіну-80 (Полісорбат LAUROPAN T/80, Італія). Дози препаратів запозичені з літературних джерел і знаходилися в діапазоні терапевтичних (ED_{50}), які рекомендовані в дослідженнях знеболюючих, нейропротекторних чи органопротекторних властивостей в експерименті (табл. 2.1). Контрольна група тварин в тому ж режимі одержувала дистильовану воду.

Таблиця 2.1

Групи фармакологічних засобів

Фармакологічна група	Назва лікарського препарату (Торгова назва, виробник)	Доза, мг/кг	Літературні посилання	Форма випуску
1	2	3	4	5
Неопіодні анальгетики	Пара-ацетамінофенол (Парацетамол, ПАТ «Галичфарм», Україна), серія 030415	150	[79, 100]	Таблетки по 0,2 г
	2-[(2,6-дихлорфеніл)аміно]-фенілацетат натрію (Диклофенак натрію, ПАТ «Красная звезда», Україна), серія 730915	10	[212, 305]	Таблетки по 0,05 г

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4	5
Неопіодні анальгетики	(RS)-2-(4-ізобутилфеніл) пропіонова кислота (Ібупрофен, ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна), серія 101115	5	[165, 289]	Таблетки по 0,2 г
	Лорноксикам (Ксефокам, «Nycomed Austria GmbH», Австрія), серія 11001958	10	[259]	Таблетки по 0,004 г
	Мелоксикам (Мелоксикам-ратіофарм, «Ratiopharm», Німеччина), серія R17897	10	[83]	Таблетки по 0,015 г
	Целекоксиб (Ранселекс, «Ranbaxy Laboratories Limited», Індія), серія 2547311	50	[279]	Капсули по 0,1 г
	Кеторолаку трометамін (Кеторол, «Dr. Reddy's Laboratories», Індія), серія B500175	5	[314]	Таблетки по 0,01 г
Антиконвульсанти	Карбамазепін (Карбамазепін-Здоров'я, ФК «Здоров'я», Україна), серія 280915	150	[190, 249]	Таблетки по 0,2 г
	Топірамат (Топіромакс, ТОВ «Фарма Старт», Україна), серія 190414	300		Таблетки по 0,1 г
	Вальпроат натрію (Вальпроком 500 хроно, ТОВ «Фарма Старт», Україна), серія 810915	155		Таблетки 0,5 г (в перерахунку на натрію вальпроат)
	Габапентин (Габалепт 300, «Micro Labs Limited», Індія), серія GBLH0056	100		Капсули по 0,3 г
	Прегабалін (Лірика, «Pfizer GmbH», Німеччина), серія L91037	100	[300]	Капсули по 0,3 г
Антидепресанти	Амітриптиліну гідрохлорид (Амітриптилін, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна), серія 130915	150	[15, 229]	Таблетки по 0,025 г
	Флуоксетин (Флуоксетин- ГНЦЛС, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна), серія 210415	300	[15, 202]	Таблетки по 0,02 г
	Пароксетину гідрохлорид (Пароксетин, ТОВ «Фарма Старт», Україна), серія 280915	100	[15, 44]	Таблетки по 0,02 г
	Тразодону гідрохлорид (Триттіко, «Angelini Francesco», Італія), серія 1147	155	[328]	Таблетки по 0,15 г

Продовження табл. 2.1

Засоби нейропротективно-антиоксидантного комплексу	Нейровітан («Al-Hikma Pharmaceuticals», Йорданія), серія F60965	25 (по октотіаміну)	[97]	Таблетки октотіаміну 0,025 г + рибофлавіну 0,0025 г + піридоксину 0,04 г + ціано- кобаламіну 0,00025 г
	Цитиколін (Цераксон, «Ferrer Internacional S.A.», Іспанія) серія D003U1	500	[281, 324]	Розчин для перорального вживання, 100 мг/1 мл
	Альфа-ліпоєва кислота (Берлітрон 300 ораль, «Berlin-Chemie/Menarini Group», Німеччина), серія 33053	50	[54, 250]	Таблетки по 0,3 г
	Ніцерголін (Ніцерголін, корпорація «Arterium», Україна), серія 080715	10	[299]	Таблетки по 0,01 г
	Донепезилу гідрохлорид (Альмер, «Actavis Group», Ісландія), серія F60965	10	[245]	Таблетки по 0,005 г

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Відтворення еквіваленту розсіяного склерозу у щурів

Відтворюваний в лабораторних умовах експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) представляє відносну, наближену модель демієлінізуючих захворювань людини. Проте біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при ЕАЕ мають принципову схожість з аналогічними змінами, що супроводжують аутоімунні демієлінізуючі ураження нервової системи в клініці, що дає підставу вважати експериментальний алергічний енцефаломієліт адекватною та оптимальною моделлю, яка дозволяє суттєво розширити межі досліджень питань етіології, патогенезу, терапії та профілактики демієлінізуючих захворювань [64, 76, 207, 239].

У даному 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 [3, 114, 146]. 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 [280]. Активовані Т-клітини ($CD4^+$), інші лімфоцити і макрофаги мігрують в ЦНС через пошкоджений ГЕБ. Продукція лімфоцитами і гліальними клітинами запальних факторів обумовлює формування вогнищ запалення, демієлінізацію і фагоцитоз залишків мієліну [219]. Зокрема, на ранніх стадіях гострої форми експериментального алергічного енцефаломієліту запальні цитокіни [275] і хемокіни [309] можуть ініціювати токсичний ефект щодо олігодендроцитів, який, імовірно, опосередковується дією $TNF-\alpha$ або вільних радикалів; підвищення рівня останніх обумовлено надмірною активністю NO-синтази [243]. Макрофаги, які проникають в тканини ЦНС, можуть фагоцитувати мієлін і синтезувати ряд факторів, потенційно небезпечних для мієлінових оболонок [301].

Для формування експериментального алергічного енцефаломієліту використовували гомогенат гомологічного головного мозку, який за енцефалітогенністю суттєво переважає гомогенат гетерогенного головного чи спинного мозку, та повний ад'ювант Фрейнда. Гомогенат головного мозку одержували шляхом 3-хвилинної апаратної гомогенізації при кімнатній температурі тканини мозку в буферному розчині (0,175 М KCl + 0,125 М трис-HCl при pH = 7,4) з холодильника з розрахунку 33,5 мг тканини мозку + 0,05 мл буфера/ 100 г маси щура. Для приготування 2,5 мл повного ад'юванта Фрейнда використовували 2,1 мл вазелінового масла, 0,4 мл безводного ланоліну та 1мг БЦЖ. При цьому 1 мг навіски сухого порошку вбитих

нагріванням *M. tuberculosis* розтирали в порцеляновій ступці в невеликому (1 мл) об'ємі вазелінового масла. До отриманої суспензії додавали залишок масла та 0,4 мл безводного ланоліну, а після їх змішування – гомогенат мозку у співвідношенні 1:1. Одержану суміш «переганяли» з шприца в шприц через перехідник до загуснення емульсії, якість якої контролювали нанесенням її краплі на поверхню «крижаної» дистильованої води. Крапля стабільної водно-масляної емульсії короткочасно занурювалась, після чого, не розтікаючись, плавала на поверхні води.

Енцефалітогенну емульсію (повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ) + гомогенат мозку у співвідношенні 1:1) вводили в сполучну тканину хвоста експериментальних щурів з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тварини. Щодня протягом місяця (середня тривалість ЕАЕ) тварин зважували і оцінювали їх неврологічний статус: реєстрували час початку захворювання, його тривалість і тяжкість неврологічних розладів, яку оцінювали в балах за клінічним індексом. Клінічний індекс визначали за шкалою: м'язова слабкість однієї кінцівки – ½ бали, парез – 1 бал, параліч – 1 ½ бали. При залученні в процес декількох кінцівок підсумовували бали. Відсутність порушень приймали за 0 балів, летальний результат – 6 балів. Тварин з клінічними індексом ½ - 2 ½ бали вважали такими, які легко «хворіють»; 3 – 6 балів відповідало важкого перебігу ЕАЕ. Для інтегративної оцінки тяжкості експериментального алергічного енцефаломієліту для кожної тварини розраховували кумулятивний індекс – суму індивідуальних клінічних індексів за період «хвороби». Крім того, для групи щурів активного контролю розраховували: 1) тривалість латентного періоду ЕАЕ; 2) загальне число «хворих» і «важко хворих» щурів (в % від кількості у групі); 3) середній клінічний індекс на піку захворювання; 4) середній кумулятивний індекс хвороби; 5) середню тривалість захворювання [64, 76, 114, 146, 183].

Отримані результати порівнювали з групою контрольних інтактних тварин, яким в аналогічному режимі вводили фізіологічний розчин.

Таблиця 2.2

Структура експериментального дослідження

№	Етап дослідження	Групи тварин	Основні методи для оцінки	Дослідні показники/групи тварин, що досліджувалися
1	Проведення порівняльних фармакологічних досліджень антиноцицептивної активності неопіїдних і ад'ювантних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. Обґрунтування стратегії раціональної терапії знеболюючими засобами при ЕАЕ.	I – інтактні (пасивний контроль); II – тварини з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ, активний контроль); III – ЕАЕ + метилпреднізолон (МП); IV – ЕАЕ + МП + парацетамол; V – ЕАЕ + МП + диклофенак; VI – ЕАЕ + МП + ібупрофен; VII – ЕАЕ + МП + лорноксикам; VIII – ЕАЕ + МП + мелоксикам; IX – ЕАЕ + МП + кеторолак; X – ЕАЕ + МП + карбамазепін; XI – ЕАЕ + МП + топірамат; XII – ЕАЕ + МП + вальпроат натрію; XIII – ЕАЕ + МП + габапентин; XIV – ЕАЕ + МП + прегабалін; XV – ЕАЕ + МП + амітриптилін; XVI – ЕАЕ + МП + флуоксетин; XVII – ЕАЕ + МП + пароксетин; XVIII – ЕАЕ + МП + тразодон	Антиноцицептивний потенціал	Величина порогу больової чутливості/всі
			Орієнтовно-дослідницька активність	Кількість перетнутих квадратів, вертикальних підйомів, досліджених «нірок» в тесті «відкрите поле»/всі
			Оцінка м'язового тону	Тривалість «зависання»/ всі
			Оцінка антидепресивної активності	Латентний період іммобільності, загальна кількість «зависань», сумарний час іммобільності в тесті Порсолта/ II, III, XV – XVIII
			Потенціювання медикаментозного сну	Латентний період та тривалість сну/ II, III, XV – XVIII
			Оцінка проявів невропатичного больового синдрому	Величина порогу тактильної аллодинії, кількість здригань, латентний період уникнення («hot plate»)/ II, III, X – XVIII
			Протизапальна активність	Активність PGH-синтази/ I – III, V – VIII
			Дослідження оксидантно-антиоксидантної напруги	МДА, СОД / I – III, X – XIV
			Дослідження фармакокінетичної сумісності інгредієнтів	Комп'ютерне моделювання/ VIII, XIII
			Гістоморфологічні дослідження	Ультраструктурне дослідження гіпокампу та кори головного мозку/ II, III, VIII, XIII, XVIII

2	Проведення порівняльних фармакологічних досліджень нейропротекторної активності засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. Пошук можливостей оптимізації фармакотерапії когнітивних і нейродегенеративних порушень при ЕАЕ	I – інтактні (пасивний контроль); II – тварини з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ, активний контроль); III – ЕАЕ + метилпреднізолон (МП); IV – ЕАЕ + МП + нейровітан; V – ЕАЕ + МП + альфа-ліпоева кислота; VI – ЕАЕ + МП + ніцерголін; VII – ЕАЕ + МП + донепезил; VIII – ЕАЕ + МП + цитиколін	Оцінка перебігу ЕАЕ	Латентний період та тривалість ЕАЕ, клінічний індекс, кумулятивний індекс/ II – VIII
			Орієнтовно-дослідницька активність	Кількість перетнутих квадратів, вертикальних підйомів, досліджених «нірок» в тесті «відкрите поле»/ I – III, V – VIII
			Когнітивні функції	Латентний період УРПУ, K_{Aa} , $K_{ПВВ}$ / I – III, V – VIII
			Оцінка проявів невропатичного больового синдрому	Величина порогу тактильної аллодинії, кількість здригань (формаліновий тест), латентний період уникнення («hot plate»)/ I – III, V – VIII
			Дослідження енергетичного обміну	Лактат, піруват, малат, ізоцитрат, аспартат, АТФ, АМФ, АДФ, КФК, ВВ-КФК/ I – III, VIII
			Визначення мітопротективних властивостей	$\Delta\psi_m$, Ψ / I – III, VIII
			Оцінка морфо-функціональних показників нейронів	Щільність та площа нейронів, вміст РНК, доля апоптичних клітин / I – III, VIII
			Дослідження фармакокінетичної сумісності інгредієнтів	Комп'ютерне моделювання/ VIII
			Гістоморфологічні дослідження	Ультраструктурне дослідження гіпокампу та кори головного мозку / I – III, VIII

2.2.2. Методи дослідження інтегративних функцій мозку

2.2.2.1. Дослідження рухово-дослідницької активності

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. Дана модель заснована на конфлікті двох мотивацій – інстинктивної тенденції до дослідження нового становища і тенденції до мінімізації можливої небезпеки з його сторони.

Експериментальна установка «відкрите поле» представляє собою добре освітлену квадратну площадку розмірами 100 х 100 см з білими вертикальними стінками висотою 40 см. На всій площині підлоги даної установки рівномірно розміщені 16 отворів («нірок») діаметром 6 см. Тварин по черзі приміщували в центр поверхні і на протязі 3 хвилин відстежували їх поведінку. Цілісну оцінку проводили по кількості перетнутих квадратів (горизонтальна активність), вертикальних підйомів та заглядань у нірки (дослідницька активність) на 12 та 17 добу експерименту [81].

2.2.2.2. Визначення впливу на процеси навчання та консолідації енграм пам'яті

Феноменологія розладів вищих психічних функцій при розсіяному склерозі стала предметом низки досліджень, проведених за останні роки. При цьому вираженість порушень у когнітивній сфері дуже різна – від повного збереження до важких розладів вже на ранніх стадіях хвороби [13, 84].

У даному дослідженні оцінку інтегративних функцій головного мозку у щурів проведено в тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ). Вказаний рефлекс формували в камері розміром 60 × 30 × 35 см, поділеній на три рівних відсіки; з освітленого центрального відсіку дверцята вели до темних бокових [80]. Центральний відсік є освітленим, а лівий та правий

темними та оснащені електрифікованою підлогою. Дана модифікація, на відміну від класичної – двохкамерної, дозволяє оцінювати просторовий компонент пам'яті.

Для аналізу процесів вводу інформації засоби застосовували з другої по 10-у добу після індукції ЕАЕ (латентна фаза). З метою визначення фармакологічного впливу на процеси збереження умовної навички, використовували подальше введення препаратів протягом 20 діб (середня тривалість ЕАЕ). На 10-ий дослідний день після інокуляції енцефалітогенної емульсії тварин приміщували в камеру з відкритими дверцятами і протягом 3 хвилин фіксували латентний період заходу в один з темних відсіків (ЛП₁).

На 12-ий день тварин поміщали в світлий відсік, при цьому дверцята в лівий відсік залишалися закритими. Після заходу щура в правий відсік, дверцята закривали і тварині через електрифіковану підлогу наносили 5 ударів струмом силою 1 мА з інтервалом 5 с та тривалістю кожного імпульсу – 1 с. Реєстрували латентний період заходу в темний відсік (ЛП₂).

На 20-ту добу проводили тестування. Тварин поміщали в стартовий відсік при обох відкритих дверцятах. Спостереження проводилося на протязі 3 хвилин. Важливим критерієм на даному етапі була кількість тварин, що залишилися у центральному відсіку, що свідчила про ступінь навчання експериментальних тварин. Також фіксували латентний період заходу до темного відсіку (ЛП₃) для тварин з відсутньою навичкою та просторовий вибір (правий «небезпечний» чи лівий «безпечний»). Для тварин, що залишилися у центральній зоні на протязі 3 хвилин, латентний період приймався за 180 с. Просторову перевагу оцінювали по двох показниках: кількості тварин, що залишилися в центральному відсікові, та коефіцієнтові переваги безпечного відсіку ($K_{\text{ПБВ}}$; часткове відділення числа щурів, що вибрали «безпечний» відсік на кількість тварин, які вибрали «небезпечний».

При збереженні мнестичних процесів тварина пам'ятала про нанесене в темній камері електробольове подразнення, тому більша різниця між ЛП₁ і

ЛП₂ (ΔЛП₂₋₁), а також ЛП₁ і ЛП₃ (ΔЛП₃₋₁) свідчило про кращий ступінь запам'ятовування [178].

Для оцінки ефективності відтворення навички УРПУ при використанні досліджуваних препаратів та їх комбінацій вираховували коефіцієнт антиамнестичної активності (K_{Аа}) по наступній формулі [173]:

$$K_{Аа} = (\Delta ЛП_{\text{препарат}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) / (\Delta ЛП_{\text{інтактні}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) \cdot 100\%,$$

де ΔЛП = ЛП_{тестування} – ЛП_{вироблення рефлексу}

2.2.3. Дослідження анальгетичної активності

Реакція організму людини і тварин на біль є багатокomпонентною та включає різноманітні емоційні, моторні, вегетативні та гуморальні прояви. Ці показники необхідно диференціювати при вивченні анальгетиків, які повинні пригнічувати реакцію на біль не тільки в її моторному і вегетативно-гуморальному, але й і в психологічному вираженні.

Експериментальних підходів щодо визначення рівня ноцицептивного реагування існує достатньо багато [228, 238, 308]. Для оцінки антиноцицептивної активності знеболюючих засобів нами використаний метод електричного подразнення кореня хвоста щура. Для цього сталі голчасті електроди (діаметром 0,5 мм) з фіксованою міжелектродною відстанню (10 мм) вводились під шкіру дистальніше 1 см от кореня хвоста. Оцінку больової чутливості здійснювали через 2-3 хвилини (тварина заспокоювалася), 30, 60, 90, 120 та 180 хвилин по появі голосової реакції (писк, вокалізація) у відповідь на поступово зростаюче електричне подразнення від електростимулятора ЕСЛ-1. Тривалість кожного подразника не перевищувала 1 с [102, 238, 248]. Використанню даного критерію оцінки анальгезії надавали перевагу перед іншими, що також широко застосовуються в експерименті, тестами. Це пов'язано з тим, що голосова реакція зумовлена функціонуванням не тільки спинальних, але й надсегментарних структур мозку. Крім того, використання таких ноцицептивних тестів, як «hot plate» и «tail flick» дозволяє оцінити тільки відповідну реакцію на ноцицептивний

вплив, але не завжди дає змогу реально визначити вираженість анальгезії, зокрема, при наявності моторного дефіциту у тварин [35].

2.2.4. Оцінка м'язової сили

Розсіяний склероз супроводжується розповсюдженим ураженням мієліну з порушенням нервової, імунної та ендокринної регулюючих систем. У більшості випадків демієлінізація визначає розвиток неврологічного дефіциту, оцінку якого проводять з використанням тестів складної рухової поведінки.

У даному дослідженні для оцінки неврологічного дефіциту застосовували метод реєстрації м'язової сили в тесті підтягування на горизонтальній перекладині. Для цього тварини підвішувалися передніми лапами на дріт, натягнутий на висоті 20 – 30 см від поверхні стола. Інтактні щури, які мали фізіологічний тонус, швидко підтягувалися і утримувалися на перекладині чотирма лапами. Невиконання цього тесту щурами експериментальних груп свідчило про порушення м'язової сили і розвиток неврологічного дефіциту [50, 75, 194].

2.2.5. Методи дослідження нейротропних ефектів антидепресантів

2.2.5.1. Аналіз антидепресивної активності

Одним з клінічних проявів хронічного запального та демієлінізуючого процесу при розсіяному склерозі є порушення вищих кіркових функцій, яким до недавнього часу приділялася недостатня увага при аналізі неврологічного статусу та оцінці ефективності лікування. При цьому більше половини хворих вже на початкових стадіях захворювання пред'являють скарги на стійкі порушення нейропсихічних функцій (біль, інсомнія) і практично всі в тій чи іншій мірі мають нейропсихічні розлади (зменшення м'язової сили, дезадаптація та депресія) [64].

Депресія – досить частий супутник РС. Більше того, понад 50%

пацієнтів з РС в різний період хвороби відчувають настільки серйозні симптоми депресії, що потребують медикаментозної корекції [319].

Однією з загальновизнаних і найбільш широко використовуваних моделей вивчення депресивного стану, що застосовуються в сучасних дослідженнях, є тест-модель Порсолта (тест форсованого або примусового плавання) [304]. Вважають [179], що відсутність в моделі можливості уникнути небезпеки відображає саме стан депресії, але не стан тривожності і страху, де можливість уникнення передбачається. Тест Порсолта включений як один з головних для дослідження впливу препаратів та нових сполук на емоційно-стресові стани [192].

В даній серії експериментальних досліджень тварин розміщували у віварії групами по 10 щурів як мінімум 2 тижні до початку експерименту. Їжа та вода були без обмежень. Тестування проводилося в денний час, в проміжку між 13 і 18 год. При тестуванні щури після введення препаратів опускалися в пластиковий циліндр висотою 60 см і діаметром 50 см, в який на дві третини була налита вода температурою 23-24 °С.

Тривалість тесту становила 6 хвилин, протягом яких реєстрували поведінку тварин. Поведінковими показниками були: латентність (сек) першого «зависання» («зависанням» вважали іммобільність – повну відсутність плавальних рухів при пасивному утриманні тварини на воді більш ніж 5 секунд); кількість «зависань» і сумарний час іммобільності (сек); клімбінг (кількість спроб вибратися з циліндру).

Під впливом препаратів з антидепресивним компонентом дії латентний період до першого «зависання» і активність тварин в тесті Порсолта зростають, а час іммобільності зменшується.

2.2.5.2. Дослідження здатності потенціювання медикаментозного сну

У багатьох пацієнтів з розсіяним склерозом спостерігається безсоння або переривчастий поверхневий сон, однак його порушення не є прямим наслідком хвороби. Зазвичай вони викликані вторинними факторами:

стресом, спастичністю, обмеженою фізичною активністю або депресією. Тому метою чинного етапу дослідження була оцінка здатності антидепресантів потенціювати медикаментозний сон.

Оцінку ефективності антидепресантів в даній серії експериментальних досліджень проводили по двох показниках: часу засипання тварин (латентний період сну) та його тривалості. Медикаментозний сон викликали інтраперітонеальним введенням тіопенталу натрію (30 мг/кг) [258].

2.2.6. Методи дослідження невропатичного больового синдрому, індукованого експериментальним алергічним енцефаломієлітом

Найчисленнішу групу при розсіяному склерозі складають болі невропатичного характеру. Їх розвиток зумовлений осередками демієлінізації в нервовій системі, що призводить до змін функціонування іонних каналів у пошкоджених аксонах та формування ектопічних вогнищ генерації нервових імпульсів. Невропатичні болі при розсіяному склерозі можуть проявлятися печінням, дизестезіями, поколюванням або відчуттям болю у відповідь на небольовий стимул [5].

2.2.6.1. Оцінка тактильної алодинії

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 [307].

Щурів поміщали в плексигласові клітини з дротяним дном, що дозволяв торкатися лап, і давали їм можливість звикнути протягом 10-15 хвилин. Пробу проводили в середині підошви лівої задньої лапи, уникаючи менш чутливих подушечок на підошвах. До лапи підносили набір з 8 волосків von Frey з логарифмічно зростаючою жорсткістю (0,41, 0,69, 1,20, 2,04, 3,63, 5,50, 8,51 і 15,14 м). Волосок фон Фрея прикладали перпендикулярно до середньопідошвенної поверхні в зоні розподілу відростків сідничного нерва та повільно вдавлювали до появи їх вигину.

Пробу починали з волокна найменшого діаметра. З кожним волокном проводили п'ять дослідів з проміжком, рівним близько 2 хвилин. Кожен вплив тривав протягом 4-6 секунд або до тих пір, поки не спостерігалось ноцицептивне відсмикування. При відсутності реакції відсмикування лапи на початково вибраний волосок використовували більш сильний подразник. Реакція вважалась позитивною в тому випадку, якщо щур різко відсмикував лапу (здрогання відразу ж після видалення волосини також вважалось позитивною реакцією). Переміщення тварини вважалось незрозумілою реакцією, і в таких випадках пробу повторювали. У тих випадках, коли пороги виходили за межі подразників, враховувалась величина 15,14 (нормальна чутливість) або 0,41 (максимально алодинічна).

2.2.6.2. Вивчення проявів хімічної гіпералгезії

Оцінку проявів хімічної гіпералгезії проводили з використанням формалінового тесту [288].

Тварин усіх груп привчали до камери спостереження протягом 1 години перед отриманням підшкірної ін'єкції 0,05 мл 0,5 % розчину формаліну (Acros organics, США) в тильну поверхню стопи правої задньої кінцівки. Розчин формаліну застосовували через 30 хвилин після закінчення курсу введення тест-зразка.

Поведінкові реакції реєстрували відразу ж після підшкірної ін'єкції формаліну в дорсальну поверхню лапки шляхом підрахунку числа здрогувань тварини. Спостереження здійснювали протягом 60 хвилин після ін'єкції формаліну і реєстрували як відповіді ранньої фази (0-10 хвилин після ін'єкції формаліну) і відповіді пізньої фази (20-60 хвилин після ін'єкції формаліну).

2.2.6.3. Аналіз проявів термальної гіпералгезії

Вивчення проявів термічної гіпералгезії проводили з використанням тесту «гаряча пластина» [269].

При застосуванні даного тесту тварин по черзі поміщали на пластину, нагріту до 57–58 °С; температуру поверхні пластини регулювали термостатом. За секундоміром фіксували час від моменту поміщення тварини на пластину до моменту першого облизування лап (задніх), що і становило латентний період реакції облизування лапок (ЛП РОЛ). Максимальний час перебування тварини на пластині не перевищував 25 секунд.

2.2.7. Біохімічні дослідження

2.2.7.1. Дослідження маркерів окисдантно-антиоксидантної напруги

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).

Підготовка проб. На 20 добу спостережень, після досягнення глибокого наркозу, індукованого внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію (40 мг/кг), тварини виводились з експерименту шляхом декапітації. Швидко розкривалась черепна коробка, на лід виймався головний мозок і виділялись фрагменти кори та гіпокамп. В подальшому виділені фрагменти на холоді ($+4^{\circ}\text{C}$) гомогенізувалися за допомогою скляного гомогенізатора в сольовому ізотонічному середовищі - 0,15 М розчин KCl з розрахунку тканина/розчин KCl 1:40 [187]. Після чого, для отримання цитозольної фракції, протягом 10 хвилин проводили диференційне центрифугування при 15000 g і температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Отриманий супернатант зливали в чисті пробірки. Екстракцію ліпідів проводили за методом Кейтса з використанням 5,0 мл гептан-ізопропанолової суміші у співвідношенні 2:1 [187]. Безбілковий екстракт отримували додаванням точного навішування гомогенату тканини в хлорну кислоту (0,6 М HClO_4) з подальшою нейтралізацією 5 М розчином карбонату калію.

Визначення вмісту МДА. ТБК-залежні продукти перекисного окислення ліпідів, зокрема – малоновий діальдегід є пізнім маркером окислювального ураження клітин.

Вміст ТБК-залежних продуктів (МДА) визначали спектрофотометрично по реакції з тіобарбітуровою кислотою. Визначення вмісту МДА виконувалось за методом І.Д. Стальної, Т.Г. Гаришвілі (1977) в модифікації М.С. Гончаренко та спів. (1985) [59, 191].

Відомо, що при кип'ятінні у кислому середовищі МДА (та ряд інших карбонільних продуктів) реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи пофарбований триметиновий комплекс з максимум поглинання при довжині хвилі 523 нм. Оптична щільність прямо пропорційна вмісту МДА.

Приготовлений біологічний матеріал у кількості 0,1 мл переносили у центрифужну пробірку, до якої в подальшому додавали 2 мл свіжоприготованого 0,8% розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК) в оцтовій кислоті (80 мг ТБК розчиняли при нагріванні в 10 мл води та змішували з 10 мл 30% льодяної оцтової кислоти). Проби на 10 хвилин поміщали на киплячу водяну баню. Як контроль використовували зразки, що містили буферний розчин. Реакція припиняли охолодженням у воді. Для видалення помутніння проби центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-56 (Російська Федерація) при довжині хвилі 523 нм. Кількість ТБК-реактантів виражали в нмоль/мг білка, виходячи з коефіцієнту молярної екстинції.

Визначення активності супероксиддисмутази. СОД являється одним з ключових ферментів системи антиоксидантного захисту. Для вивчення активності СОД в сироватці крові нами був використаний метод С. Чеварі та співавт. (1988) [199]. Він заснований на конкуренції ферменту з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксиданіони, що утворюються в системі аеробної взаємодії НАДН і фенозинметансульфату (ФМС) [199]. В результаті цієї реакції НСТ відновлюється до гідразинтетразолію, що реєструється при 540 нм. В присутності СОД відсоток відновлення НСТ змінюється. Для

визначення активності СОД 0,04 мл проби вводили в 3 мл інкубаційного середовища, що містить 0,41 мМ НСТ, 0,33 мМ ЕДТА, 0,01 мМ феназинметасульфату. Спектрофотометрично вимірювали оптичну густину розчину при довжині хвилі 540 нм, опісля додавали в кювету 0,1 мл 0,8 мМ НАДН, перемішували та залишали у темряві на 10 хвилин, в подальшому повторно вимірювали оптичну густину. За реакцією зменшення утворення гідразинтетразолію в присутності біологічного матеріалу, що містить СОД, робили висновок згідно з різницею між першим та другим показниками спектрофотометру. Активність СОД виражали в умовних одиницях на мг білка.

2.2.7.2. Метод визначення активності простагландин Н-синтетази (ЦОГ).

Проблема створення високочутливих та доступних методів визначення ферментативної активності актуальна при розробці різних експрес-тестів у медицині, екології та інших галузях. Метод визначення вмісту поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) у біологічних середках за допомогою ферментів є дуже перспективним. Відомо, що ПНЖК C₂₀ є як субстратами [189, 265], так і ферментом простагландин Н-синтетази. Перетворення ПНЖК за допомогою каталізу PGHS у простагландин H₂ включає приєднання до молекули кислоти 2-х молекул кисню та встановлення у присутності донора електронів гідроперекисної групи інтермедіатора до оксигрупи. Для визначення активності багатосубстратного ферменту PGHS використовують слідуєчі методи: 1) полярографічний, заснований на визначенні концентрації кисню; 2) флюорометричний, детектируючий продукт реакції при використанні у якості донора електронів гомованілінової кислоти; 3) спектрофотометричний [206, 227, 265], заснований на вимірюванні світло-поглинання продуктів окислення донорів електронів (табл. 2.3):

**Донори електронів, котрі використовують при
спектрофотометричному дослідженні активності PGHS**

<i>Донор електронів</i>	$\lambda_{\max}$, нм	ε_{λ} , $M^{-1}cm^{-1}$
Ферроціанід калію	420	1040
Адреналін	480	4020
Гваякол	436	6400
TMPD	611	13500
<i>транс</i> -Ферулова кислота	310	14800
ABTS	405	36800
Sg	534	65000

У роботі використовували арахідонову кислоту, адреналін, фосфат калію, трис-HCl та ТВІН-20 виробництва USA. PGH – синтетазну активність ферменту визначали спектрофотометричним методом за допомогою СФ-56 ЛОМО - спектр.

В кювету, котра вміщувала 1 мл буфера, додавали розчин 2мкМ геміну («Сінбіас»), донор електронів (використовували 0,99 мМ розчин адреналіну («ALDRICH», Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr. 2, D-89555 Steinheim, Germany) та солубілізований препарат ферменту [99]. Гомогенат тромбомаси мозку та слизової оболонки шлунка готували з допомогою буферного розчину 0,05М трис- HCl, рН 8,0, та центрифугували 20 хвилин при 13 об/хв. Надосадочну рідину зберігали при температурі від -18°C до -25°C. Солубілізований препарат ферменту готували за допомогою ТВІН – 20 (USA).

Реакцію ініціювали додаванням спиртового розчину 0,19 мМ арахідонової кислоти («ALDRICH», Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstr. 2, D-89555 Steinheim, Germany). Довжина хвилі складала 480 нм, час реєстрації показників через 1 хвилину після додавання арахідонової кислоти.

Питому активність виражали в мікромолях арахідонової кислоти, окислених 1 мг білка протягом 1 хвилини. Ферментативну активність

солюбілізованого препарату визначали спектрофотометричним методом, як початкову швидкість накопичення окисленої форми адреналіну за допомогою СФ-56 ЛОМО-спектр [26, 39, 201, 208, 265].

2.2.7.3. Дослідження мітопротективної активності

Функцію мітохондрій оцінювали по відкриванню мітохондріальної пори (МП) та мітохондріальному трансмембранному потенціалу (Ψ) [9, 101, 166]. Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 700 g. В подальшому осад видалявся, а супернатант центрифугували 15 хв при 11 000 g (4°C). Отриманий осад суспензувався в невеликому об'ємі середовища без ЕДТА і зберігався при температурі 0 - +1 °C. В подальшому суспензію мітохондрій (1 мг білка в пробі) вносили в інкубаційне середовище (70 мМ сахарози, 5 мМ HEPES, 70 мМ KCl, 0,5 – 1 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4). Відкриття мітохондріальної пори ініціювали внесенням циклоспорину-А (0,5 мл) і визначали спектрофотометрично при $\lambda = 540$ нм і при 25 °C при постійному перемішуванні на протязі 25 хв.

Дослідження мітохондріального трансмембранного потенціалу ($\Delta\psi_m$) проводили шляхом внесення в середовище 9 мкМ сафроніну О. Спектрофотометрію проводили при довжині хвилі 515 нм і 525 нм. $\Delta\psi_m$ визначали по різниці світлопоглинання при 515 нм і 525 нм ($\Delta A_{515-525 \text{ нм}}$). Даній потенціал утворюється електрохімічним градієнтом протонів по обидва боки мембрани і його підтримка забезпечується процесами переносу електронів в дихального ланцюга. $\Delta\psi_m$ може слугувати характеристикою і мітохондріальної функції, і стану клітини в цілому [166].

2.2.7.4. Методи визначення вуглеводно-енергетичного обміну

Стан енергетичного обміну в гомогенатах мозку щурів оцінювали спектрофотометрично по вмісту лактату, пірувату, ізоцитрату, малату і аспартату [187, 200].

Рівень малату визначали за методом Хохорста і оцінювали по зменшенню кількості НАДН при $\lambda = 340$ нм. Вміст лактату визначався також за методом Хохорста по збільшенню кількості НАДН при $\lambda = 340$ нм. Принцип методу полягає в тому, що в присутності малатдегідрогенази малат перетворюється в щавелевооцтову кислоту. зв'язування щавелевооцтової кислоти гідразин-гліциновим буфером забезпечує повне окиснення малату. При цьому утворення відновленої форми НАДН ензимоларно кількості окисненого малату, зростання вмісту якого реєструється при $\lambda = 340$ нм. В ході дослідження 0,2 мл безбілкового екстракту мозку додавали до 2,2 мл гідразин-гліцинового буфера. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл НАД⁺. Оптичну щільність вимірювали до запуску реакції (E_1) та через 4 хв (E_2).

Вміст малату розраховувався по формулі:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6,22}$$

де $\Delta E - (E_2 - E_1)$;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби по відношенню до тканини;

6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинції відновлених форм піридинових нуклеотидів при $\lambda = 340$ нм.

Вміст пірувату визначали методом Цоха-Ломпрехта за зменшенням кількості НАДН при $\lambda = 340$ нм. Принцип методу полягає у тому, що в присутності лактатдегідрогенази піруват відновлюється до лактата, а кількість використаного в реакції пірувату еквімолярна вмісту НАДН, зменшення якого визначалося спектрофотометрично при $\lambda = 340$ нм. В ході дослідження 0,8 мл безбілкового екстракту додавали до 1,2 мл трис-HCl буфера. Реакцію індуквали додаванням 0,05 мл розчину лактатдегідрогенази. Оптичну щільність вимірювали до запуску реакції (E_1) і через 4 хв (E_2).

Вміст пірувату розраховувався по формулі:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6,22}$$

де $\Delta E - (E_2 - E_1)$;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби по відношенню до тканини;

6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинції відновлених форм піридинових нуклеотидів при $\lambda = 340$ нм.

Визначення ізоцитрату в гомогенатах мозку проводили по методу Зібберта, яких запроваджений на тім, що під дією НАДФ-ізоцитратдегідрогенази, яка знаходиться в зразках, ізоцитрат перетворюється в α -кетоглутарат. У даних умовах кількість прореагувавшего ізоцитрату еквімолярна кількості утвореного НАДФН, приріст вмісту якого визначається спектрофотометрично при $\lambda = 340$ нм. В ході дослідження для осідання білків до гомогенату тканин мозку додавали 6% хлорну кислоту у співвідношенні тканина/кислота – 1:4. В подальшому пробу перемішували і центрифугували на протязі 15 хв при 3000 g та температурі $+15^\circ\text{C}$. Безбілковий екстракт переносили в центрифужну пробірку та видаляли надлишок хлорної кислоти додаванням по краплям 24% розчину гідрокарбонату калію. Осад перхлорату калію відділяли центрифугуванням на протязі 5 хв при 3000 g та температурі $+15^\circ\text{C}$. Нейтралізований безбілковий екстракт нагрівали нагрівають до кімнатної температури та використовують для ферментативної реакції. Перед проведенням реакції компоненти інкубаційної суміші змішувались. В подальшому в кювету додавали 0,05 мл розведеного розчину НАДФ-ізоцитратдегідрогенази, перемішували та вимірювали величину оптичної щільності (E_1). Ферментативну реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл нейтралізованого тканинного екстракту, затим пробу перемішували і опісля завершення реакції записували кінцеві показники спектрофотометрії.

Вміст ізоцитрату розраховувався по формулі:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6,22}$$

де $\Delta E - (E_2 - E_1)$ зміни щільності в процесі ферментативної реакції;

V – кінцевий об'єм проби;

K – коефіцієнт розведення проби по відношенню до 1 г тканини.

6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинції відновлених форм піридинових нуклеотидів при $\lambda = 340$ нм.

Для визначення інтенсивності реакцій гліколізу досліджували вміст лактату по методу Хохорста. Принцип методу заключається в перетворенні лактату в піруват в присутності лактатдегідрогенази, при цьому зв'язування пірувату, що утворюється в процесі реакції гідразин-гліциновим буфером сприяє повному окисненню лактату. При цьому утворення відновленої форми НАД еквімолярно кількості окисненого лактату, зростання рівнів якого реєстрували при $\lambda = 340$ нм.

В ході дослідження 0,2 мл безбілкового екстракту мозку додавали до інкубаційної суміші (2,0 мл гідразин-гліцинового буфера та 0,2 мл розчину НАД). Оптичну щільність вимірювали до запуску реакції (E_1) та через 4 хв (E_2).

Вміст лактату розраховувався по формулі:

$$C = \frac{\Delta E \cdot K \cdot V}{6,22}$$

де $\Delta E - (E_2 - E_1)$;

V – кінцевий об'єм проби в кюветі;

K – коефіцієнт розведення проби по відношенню до тканини;

6,22 - коефіцієнт мікромолярної екстинції відновлених форм піридинових нуклеотидів при $\lambda = 340$ нм.

Аденінові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії в безбілковому екстракті тканини головного мозку 1:10 (10% розчин трихлороцтової кислоти) на пластинках фірми «Merk» (Німеччина) [16, 77].

2.2.8. Оцінка фармакокінетичної сумісності інгредієнтів комбінацій-лідерів

Комбіноване застосування фізіологічно активних сполук в одній лікарській формі спрямоване на оптимізацію фармакотерапевтичного впливу, що досягається доповненням необхідними компонентами фармакологічного впливу, ослабленням побічних ефектів, зменшенням дозування з урахуванням потенційного синергізму використовуваних препаратів і збільшенням зручності прийому готових лікарських форм. Разом з тим, успішне застосування комбінованих лікарських форм обмежено можливою взаємодією індивідуальних сполук на фізико-хімічному, фармацевтичному і біологічному рівнях (фармакологічна взаємодія) і вимагає попередньої оцінки можливості взаємодії та потенційної сумісності окремих фармацевтичних інгредієнтів. Дана вимога може бути реалізована з використанням підходів комп'ютерного моделювання, що враховує взаємодію як на хімічному рівні (утворення солей, перебіг реакцій конденсації, циклізації тощо), так і на рівні організму з урахуванням відомих механізмів розвитку біологічної відповіді. З практичної точки зору перспективним є комбіноване використання препаратів, фармакологічний ефект яких є однонаправленим, проте розвивається за рахунок різних фізіологічних механізмів або шляхом впливу на різні ділянки патологічного процесу.

У зв'язку з цим нами проведено 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 [211]. Молекулярна маса, розчинність, ліпофільність визначалися адитивними методами з використанням

комп'ютерних програм [244, 246, 306]. Типи біологічних мішеней (рецептори, ферменти, транспортери) були визначені з використанням відповідних літературних джерел.

2.2.9. Гістоморфометричні методи дослідження

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). Визначали наступні показники:

- щільність нейронів (кількість клітин на 1 мм^2 площі зрізу кори мозку);
- площа тіл нейронів, (мкм^2);
- концентрацію РНК в нейронах, (одиниці оптичної щільності, O_{opt}), які розраховували по формулі $\text{GREY}_i = |\lg(D_i / D_0)|$, як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини (D_i) до оптичної щільності міжклітинної речовини (D_0);
- кількість апоптично і деструктивно змінених клітин, клітин/ мм^2 .

Для визначення вмісту нуклеїнових кислот, зрізи депарафінували та фарбували галоціанінхромовими квасцями за Ейнарсом [171, 181].

Для визначення кількості нейронів у стані апоптозу та некрозу використаний метод диференційного профарбовування клітин флуоресцентними барвниками: hoecht 33342 (апоптоз) та етидіум бромід (некроз).

Для проведення досліджень фрагмент мозку тварин фіксували у рідині Карнуа (18 годин) і по стандартній схемі заливали в парафінові блоки, з яких

виготовляли серійні фронтальні 5-мікронні гістологічні зрізи в ділянці постцентральної звивини [10]. При цьому в проекції зрізу знаходились зона сомато-сенсорної кори великих півкуль, гіпокампу, судинної оболонки мозку, судинного сплетення шлуночків мозку, гілок середньо - мозкової та очної артерії.

Для ультраструктурного дослідження отримані зразки гіпокампа та кори головного мозку протягом 3-4 годин фіксували при $+2^{\circ}\text{C}$ в 2,5% розчині глютаральдегіду, виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (pH7,3). Подальша фіксація проводилась в 1% забуференому (pH7,4) розчині тетраоксиду осмію («SPI», США) протягом 1 години. Зневоднювання зразків тканин проводили в спиртах зростаючої концентрації та завершали трьома змінами пропіленоксиду. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію Епон-812 («SPI-Pon™ 812 Epoxy Embedding Kit», США). Перед приготуванням ультратонких зрізів попередньо проводили аналіз напівтонких зрізів на основі методу світлової мікроскопії. Виготовлення ультратонких зрізів товщиною 60-80 нм проводили на ультрамікромі УМТП-6 М («SELMi», Україна) з подальшим їх розміщенням на опорних сітках (Mesh Regular Grid 200). Подвійне контрастування проводили 2% водним розчином уранілацетату на протязі 15 хв при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ с наступною імпрегнацією розчином цитрату свинцю по методу Рейнольдса на протязі 30 хв [313]. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 («SELMi», Україна) при напрузі прискорення 70-75кВ і первинних збільшеннях від 4000 до 20000 за стандартною схемою. Підготовку матеріалу для ультраструктурного аналізу проводили згідно загальноприйнятих стандартів [180, 197]. Оцінку ультраструктурних змін проводили по аналізу особливостей змін нейронального, гліального та мікроциркуляторного компонентів гіпокампу та кори великих півкуль головного мозку по наступним критеріям [116]:

Нейрони

Перикаріон:

- Ядро: локалізація, стан хроматину, ядерна мембрана, ядерце;
- Органели: ендоплазматична сітка, субстанція Нісля, рибосоми, комплекс Гольджі, мітохондрії, лізосоми;
- Нейрофіламенти;
- Включення: ліпофусцин.

Відростки: дендрити, аксони, стан мієлінової оболонки.

Компоненти нейроглії: олігодендроцити, астроцити.

Гемомікроциркуляторне русло: ендотеліоцити, базальна мембрана, периваскулярний простір, астроцити.

Синаптичний апарат

- Стан пре- та постсинаптичної частини синапсу.
- Щільність синаптичних пухирців у міжмембранному просторі.

2.2.10. Статистична обробка результатів

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний номер AGAR 909 E415822FA), Описова статистика включала розрахунки середніх арифметичних значень (M) та стандартних похибок середнього ($\pm m$).

Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Шапіро-Уїлка) [56, 92, 93, 161].

За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. 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 $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

Всі використані при виконанні даної роботи одиниці вимірювання та параметри наведені у відповідності до міжнародної системи одиниць [94].

РОЗДІЛ 3

ОЦІНКА СПЕКТРУ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕОПІОЇДНИХ АНАЛЬГЕТИКІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

3.1. Порівняльний аналіз антиноцицептивної активності неопіоїдних анальгетиків у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном

Сучасні стандарти вважають біль однією з найактуальніших медичних та соціально-економічних проблем сьогодення. Виконуючи сигнальну функцію, біль, перш за все, «попереджає» організм про небезпеку та захищає його від можливих надмірних пошкоджень. Однак, набуваючи затяжного, виснажливого характеру, біль викликає цілий каскад дезадаптивних реакцій.

Натепер розрізняють два основних типи болю: невропатичний та ноцицептивний. Невропатичний біль є результатом прямого пошкодження центрального чи периферичного відділу нервової системи, тоді як біль запального генезу завжди пов'язаний з гострим чи хронічним запальним процесом. В популяції невропатичний біль зустрічається у 1 – 1,5% випадків та об'єднує цілу групу хронічних больових синдромів при різних моно - та поліневропатіях [33, 160, 170]. Типовими прикладами невропатичного болю є невралгія трійчастого нерву, фантомні болі, больовий синдром при розсіяному склерозі (РС) та при ураженнях спинного мозку тощо.

Традиційно для усунення або ж ослаблення проявів больового синдрому малої та середньої інтенсивності застосовують неопіоїдні анальгетики, в тому числі нестероїдні протизапальні лікарські засоби

(НПЗЛЗ) та анальгетики-антипіретики [37]. Зазвичай їх призначають для лікування ноцицептивних больових синдромів; проте вони можуть бути ефективними і при невропатичних болях (ломоті, статичній гіпералгезії, больовому синдромі при розсіяному склерозі), що визначає наукову та практичну значимість системних порівняльних фармакологічних досліджень механізмів активності лікарських засобів (в т.ч. болезаспокійливої терапії) і створює теоретичні передумови оптимізації фармакотерапії болю у хворих на РС [11].

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз знеболюючого потенціалу НПЗЛЗ (диклофенаку натрію, ібупрофену, лорноксикаму, мелоксикаму, кеторолаку та целекоксибу) і анальгетика-антипіретика парацетамолу у інтактних тварин та за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

Дослідження проведенні на 90 білих нелінійних щурах масою 270-320 г, які утримувались у стандартних умовах віварію ДЗ «ДМА МОЗ України». Оцінку знеболюючого потенціалу анальгетиків проводили шляхом вивчення їх антиноцицептивної активності у інтактних тварин та реєстрації ноцицептивної відповіді (реакція вокалізації) за умов сформованого ЕАЕ при одноразовому введенні засобів на тлі 5-денної терапії метилпреднізолоном за методом електричного подразнення кореня хвоста щурів (докладний опис представлений в розділі 2).

На I етапі чинного дослідження інтактних тварин методом випадкової вибірки розділили на експериментальні групи по 10 гризунів, яким одноразово інтрагастрально вводили досліджувані засоби у нижче зазначених дозах: I група – пасивний контроль (інтактні); II група – метилпреднізолон (М); III група – метилпреднізолон + диклофенак натрію (10 мг/кг); IV група – метилпреднізолон + ібупрофен (5 мг/кг); V група – метилпреднізолон + мелоксикам (10 мг/кг); VI група – метилпреднізолон + лорноксикам (10 мг/кг); VII група – метилпреднізолон + целекоксиб (50

мг/кг); VIII група –метилпреднізолон + парацетамол (150 мг/кг) та IX група – метилпреднізолон + кеторолак (5 мг/кг).

Показано, що показники больового порогу у інтактних щурів у вихідному стані реєструвались в межах від $1,76 \pm 0,08$ В (гр. контролю) до $1,96 \pm 0,11$ В (гр. кеторолаку) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив внутрішньошлункового введення НПЗЛЗ та парацетамолу на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста у інтактних тварин (n=10)

Досліджувані засоби	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості (ПБЧ), В ($M \pm m$)				
		ВС	30 хв	60 хв	90 хв	120 хв
Контроль (фізіол. р-н)	0,1 мл / 100 г	$1,76 \pm 0,08$	$1,92 \pm 0,08$	$1,65 \pm 0,10$	$1,50 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,10$
Диклофенак натрію	10	$1,92 \pm 0,14$	$2,48^{\square} \pm 0,13$	$3,12^{*\square} \pm 0,25$	$3,96^{*\square} \pm 0,29$	$3,30^{*\square} \pm 0,32$
Ібупрофен	5	$1,88 \pm 0,12$	$2,77^{\square} \pm 0,27$	$3,60^{*\square} \pm 0,32$	$4,18^{*\square} \pm 0,41$	$3,53^{*\square} \pm 0,29$
Мелоксикам	10	$1,95 \pm 0,13$	$2,88^{\square} \pm 0,14$	$3,92^{*\square} \pm 0,09$	$4,67^{*\square} \pm 0,35$	$4,91^{*\square} \pm 0,48$
Лорноксикам	10	$1,83 \pm 0,13$	$2,72^{\square} \pm 0,21$	$3,56^{*\square} \pm 0,27$	$4,37^{*\square} \pm 0,32$	$4,21^{*\square} \pm 0,21$
Целекоксиб	50	$1,85 \pm 0,12$	$2,85^{\square} \pm 0,2$	$3,72^{*\square} \pm 0,22$	$4,20^{*\square} \pm 0,37$	$4,01^{*\square} \pm 0,12$
Кеторолак	5	$1,96 \pm 0,11$	$2,98^{\square} \pm 0,09$	$4,35^{*\square} \pm 0,25$	$5,0^{*\square} \pm 0,25$	$4,66^{*\square} \pm 0,33$
Парацетамол	150	$1,95 \pm 0,13$	$2,80^{\square} \pm 0,15$	$3,87^{*\square} \pm 0,28$	$5,21^{*\square} \pm 0,21$	$4,60^{*\square} \pm 0,15$

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до ПБЧ у вихідному стані (ВС);

□ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи пасивного контролю.

Встановлено, що у інтактних тварин всі болезаспокійливі засоби виявляли виражену анальгетичну активність з максимумом прояву на 90 хвилині тестування порогу больової чутливості. При цьому на фоні введення

мелоксикаму, лорноксикаму парацетамолу та кеторолаку знеболюючий потенціал залишався достатньо високим і на 120 хвилині експерименту: +151,8% ($p \leq 0,05$), +130,05% ($p \leq 0,05$), +135,9% ($p \leq 0,05$) та +137,7% ($p \leq 0,05$) відповідно для зазначених засобів у порівнянні з показниками вихідного стану (рис. 3.1).

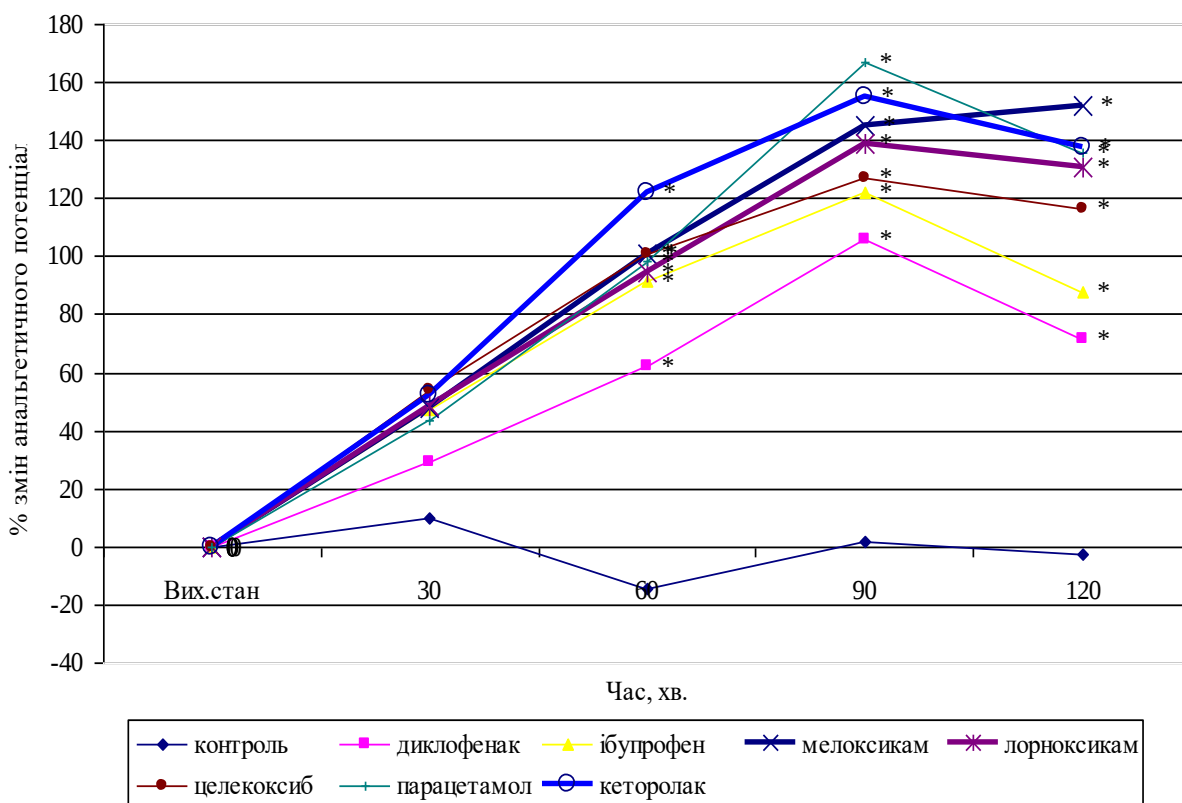


Рис. 3.1. Зміни знеболюючого потенціалу НПЗЛЗ та парацетамолу у інтактних тварин

Примітка. * - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану.

Отже, у інтактних тварин всі досліджувані засоби виявляють виражену анальгетичну активність, що відповідає даним літератури та співставно попереднім дослідженням, які проводились на базі кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «ДМА».

На II етапі чинного дослідження шляхом введення енцефалітогенної суміші в основу хвоста щурів відтворювали ЕАЕ: пік змін у тварин формувався на 11 добу експерименту; протягом наступних 5 днів щури

отримували метилпреднізолон в дозі 3,4 мг/кг в якості засобу базової патогенетичної терапії.

Тварин методом випадкової вибірки розділили на 9 дослідних груп ($n=10$), котрим одноразово внутрішньошлунково вводили тест-зразки за умов сформованого ЕАЕ: I група – активний контроль (ЕАЕ); II група – ЕАЕ + метилпреднізолон (М); III група – ЕАЕ + метилпреднізолон + диклофенак натрію (10 мг/кг); IV група – ЕАЕ + метилпреднізолон + ібупрофен (5 мг/кг); V група – ЕАЕ + метилпреднізолон + мелоксикам (10 мг/кг); VI група – ЕАЕ + метилпреднізолон + лорноксикам (10 мг/кг); VII група – ЕАЕ + метилпреднізолон + целекоксиб (50 мг/кг); VIII група – ЕАЕ + метилпреднізолон + парацетамол (150 мг/кг) та IX група – ЕАЕ + метилпреднізолон + кеторолак (5 мг/кг).

Показано, що у вихідному стані за умов сформованого ЕАЕ на тлі базової терапії метилпреднізолоном спостерігалось зниження порогу ноцицептивної відповіді на електричне подразнення хвоста у щурів всіх груп в межах від $1,4 \pm 0,12$ В (ЕАЕ, група контролю) до $1,83 \pm 0,14$ – $2,05 \pm 0,15$ В для груп, що отримували метилпреднізолон протягом 5 днів.

Реєстрація антиноцицептивної відповіді після одноразового внутрішньошлункового введення анальгетиків на тлі базової гормональної терапії проводилась на 90 хвилині (як часу прояву максимального анальгетичного ефекту досліджуваних засобів на I етапі чинного дослідження). Результати експерименту представлені в табл. 3.2 і на рис. 3.2.

Встановлено, що анальгетична активність комбінацій дослідних засобів з метилпреднізолоном складала від 90,7% ($p \leq 0,05$) для групи IV (М + ібупрофен) до 163,2% ($p \leq 0,05$) для групи IX (М + кеторолак) у порівнянні з показниками вихідного стану.

Таблиця 3.2

Вплив внутрішньошлункового введення НПЗЛЗ та парацетамолу на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста тварин за умов ЕАЕ на тлі терапії метилпреднізолоном (n=10)

Досліджувані комбінації	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості, В (М ± m)	
		BC	90 хв
ЕАЕ, контроль (фізіол. р-н)	0,1 мл / 100 г	1,03±0,12	1,35±0,13
ЕАЕ + Метилпреднізолон	3,4	1,46±0,18	2,33±0,23
ЕАЕ + М + Диклофенак натрію	3,4+10	1,83±0,14	4,0*□±0,30
ЕАЕ + М + Ібупрофен	3,4+5	2,05±0,15	3,91*□±0,35
ЕАЕ + М + Мелоксикам	3,4+10	1,91±0,16	4,82*□±0,17
ЕАЕ + М + Лорноксикам	3,4+10	2,0±0,10	4,76*□±0,44
ЕАЕ + М + Целекоксиб	3,4+50	1,68±0,13	4,06*□±0,21
ЕЕРС + М + Кеторолак	3,4+5	1,96±0,14	5,16*□±0,33
ЕАЕ + М + Парацетамол	3,4+150	2,02±0,12	5,13*□±0,27

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до ПБЧ у вихідному стані (BC);

□ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи інтактного контролю.

Порівняльним аналізом показників болезаспокійливої активності комбінацій метилпреднізолону з анальгетиками за умов сформованого ЕАЕ показано, що їх антиноцицептивний потенціал (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) зменшувався в ряду: М + мелоксикам (+257,0% ($p \leq 0,05$)) > М + лорноксикам (+252,6% ($p \leq 0,05$)) $\approx$ М + кеторолак (+252,2% ($p \leq 0,05$)) $\approx$ М + парацетамол (250,0% ($p \leq 0,05$)) > М + целекоксиб (+200,7% ($p \leq 0,05$)) $\approx$ М + диклофенак натрію (+ 196,3% ($p \leq 0,05$)) > М + ібупрофен (+189,6% ($p \leq 0,05$)).

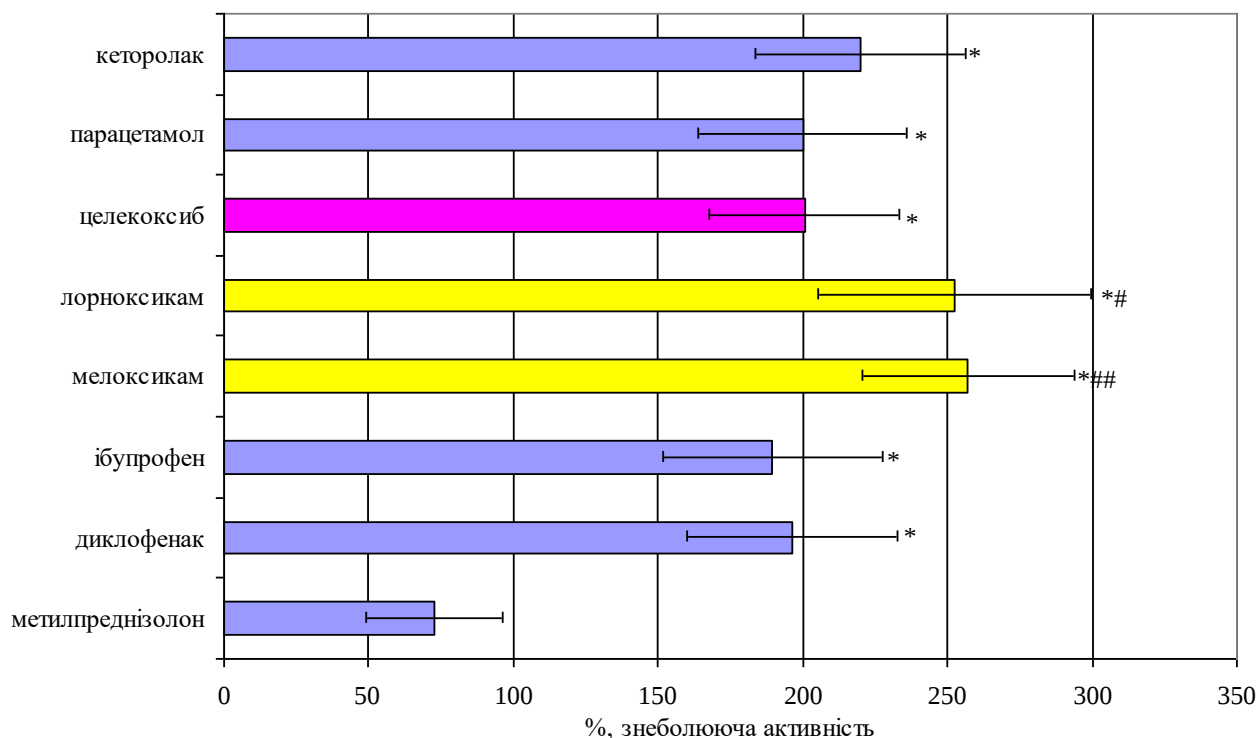


Рис. 3.2. Зміни антиноцицептивного потенціалу НПЗЛЗ та парацетамолу за умов ЕАЕ (90 хвилина) на тлі базової гормонотерапії

Примітки:

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи активного контролю (ЕАЕ);

- міжгрупові порівняння із використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, критерій Дункана.

Отже, для медикаментозної корекції больового синдрому за умов демієлінізуючої патології (ЕАЕ) на фоні базової терапії метилпреднізолоном в якості болезаспокійливих засобів доцільно рекомендувати мелоксикам, лорноксикам та кеторолак [133, 136, 140, 151, 152].

3.2. Вплив знеболюючих засобів на поведінкові реакції щурів за умов експериментальної патології

Результати дослідження проблеми розсіяного склерозу останнього часу свідчать про значну, якщо не провідну роль нейродегенеративних процесів в патогенезі захворювання, яке вже на ранніх етапах проявляється

аксональними ушкодженнями нейродегенеративного характеру [290]. При цьому пошкодження аксонів спостерігаються не тільки у вогнищах демієлінізації, а розповсюджуються вдовж усього аксонального провідника [262]. У зв'язку із зазначеним, натеper PC розглядається не тільки як аутоімунне демієлінізуюче, але і як нейродегенеративне захворювання [292, 326].

Близько 80% хворих на розсіяний склероз на ранніх стадіях захворювання мають ознаки емоційної нестійкості з багаторазовою раптовою зміною настрою за короткий проміжок часу [302]. Серед нейропсихічних порушень слід перш за все виділити зниження інтелекту, порушення поведінки, сповільненість інтелектуальних та емоційних функцій, зниження пам'яті, депресію, відчуття неспокою, що визначає наукову та практичну значимість системних порівняльних фармакологічних досліджень механізмів активності лікарських засобів (в т.ч. ад'ювантної терапії) і створює теоретичні передумови оптимізації фармакотерапії нейропсихічних розладів у хворих на PC.

В даному підрозділі представлені результати оцінки впливу анальгетиків (диклофенак натрію, ібупрофен, мелоксикам, лорноксикам, целекоксиб, парацетамол та кеторолак) на поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.

Аналізом поведінкових реакцій щурів у вихідному стані показано, що тварини всіх груп були досить активними: показники моторно-дослідницької та емоційної активності коливались в межах фізіологічної норми для гризунів вікової групи, що була задіяна на даному етапі спостережень.

Встановлено, що за умов формування експериментального алергічного енцефаломієліту у 100% тварин всіх експериментальних груп реєструвався однонаправлений характер змін поведінкових реакцій (табл. 3.3. та рис. 3.3.).

Таблиця 3.3

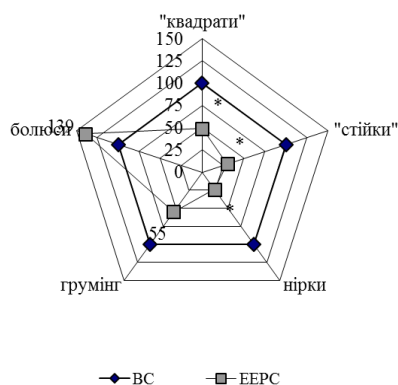
Поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на фоні сумісного введення анальгетиків з метилпреднізолоном (n=10)

Експериментальна група	Критерії оцінки тесту «відкрите поле»	Показники ($M \pm m$)		
		Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
1	2	3	4	5
ЕАЕ	квадрати	25,17±1,75	4,50±0,71	12,33±1,52
	нірки	8,33±1,08	2,50±0,22	2,50±0,67
	стійки	7,00±0,73	1,00±0,36	1,66*±0,49
	грумінг	1,50±0,22	0,66±0,21	0,83±0,16
	болюси	0,83±0,30	0,50±0,22	1,16±0,16
ЕАЕ+ Метилпреднізолон (М)	квадрати	28,83±3,0	11,33*±1,33	25,16±2,92
	нірки	9,16±0,74	2,33*±0,49	5,00*±1,03
	стійки	9,33±1,62	1,83*±0,16	8,16±1,27
	грумінг	2,66±0,61	0,50*±0,22	1,33±0,49
	болюси	1,66±0,33	1,33±0,64	1,50±0,42
ЕАЕ+М+ Диклофенак натрію	квадрати	28,16±5,25	11,16*±1,49	15,83*±1,75
	нірки	7,83±0,98	2,83*±0,30	3,83*±0,30
	стійки	11,16±2,95	2,33*±0,71	1,83*±0,30
	грумінг	1,50±0,50	0,50±0,22	1,50±0,42
	болюси	1,0±0,25	0,83±0,30	0,50±0,22
ЕАЕ+М+ Ібупрофен	квадрати	35,16±4,60	14,66±2,84	25,16±4,18
	нірки	9,33±1,28	3,50*±0,56	8,16±0,94
	стійки	8,50±0,99	3,50*±0,99	5,83±0,94
	грумінг	1,83±0,47	0,83±0,30	1,83±0,60
	болюси	0,66±0,21	0,50±0,22	1,0±0,44
ЕАЕ+М+ Мелоксикам	квадрати	34,0±2,57	10,0*±0,73	18,16*±1,88
	нірки	6,83±1,40	2,16*±0,40	2,50±0,61
	стійки	10,33±1,70	1,0*±0,51	4,16*±1,19
	грумінг	1,0±0,44	0	1,83±0,30
	болюси	1,16±0,30	1,16±0,40	1,50±0,22
ЕАЕ+М+ Лорноксикам	квадрати	32,33±3,92	16,33*±2,15	17,83*±2,60
	нірки	7,83±0,79	3,33*±0,49	6,16±0,47
	стійки	7,33±1,92	2,16*±0,65	4,50*±0,88
	грумінг	1,83±0,30	1,0±0,36	1,66±0,49
	болюси	1,33±0,21	0,66±0,21	0,83±0,30
ЕАЕ+М Целекоксиб	квадрати	34,0±2,57	10,0*±0,73	18,16*±1,88
	нірки	6,83±1,40	2,16*±0,40	2,50±0,61
	стійки	10,33±1,70	1,0*±0,51	4,16*±1,19
	грумінг	1,0±0,44	0	1,83±0,30
	болюси	1,16±0,30	1,16±0,40	1,50±0,22

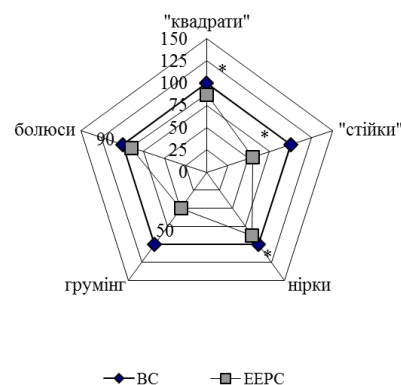
Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5
ЕАЕ+М+ Парацетамол	квадрати	32,33±3,05	7,50*±1,08	12,50*±1,38
	нірки	6,33±0,76	1,33±0,49	2,66±0,49
	стійки	9,50±0,76	0	2,50*±0,61
	грумінг	1,0±0,36	1,16±0,30	1,66±0,33
	болюси	1,50±0,56	1,83±0,30	1,33±0,21
ЕАЕ+М+ Кеторолак	квадрати	28,83±3,0	11,33*±1,33	21,33*±1,38
	нірки	9,16±0,74	2,33*±0,49	4,33*±0,84
	стійки	9,33±1,62	1,83*±0,16	1,50*±0,67
	грумінг	2,66±0,61	0,50*±0,22	1,50±0,22
	болюси	1,66±0,33	1,33±0,64	1,16±0,30

Примітка. * $p \leq 0,05$ – по відношенню до показників вихідного стану.



А



В

Рис. 3.3. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група контролю;

В – група метилпреднізолону.

Показано, що при введенні на тлі гормонотерапії метилпреднізолоном диклофенаку натрію, ібупрофену та мелоксикаму реєструвалося зниження кількості перетнутих квадратів на 43,8% ($p \leq 0,05$), 28,4% ($p \leq 0,05$) та 46,6% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками вихідного стану (рис. 3.4).

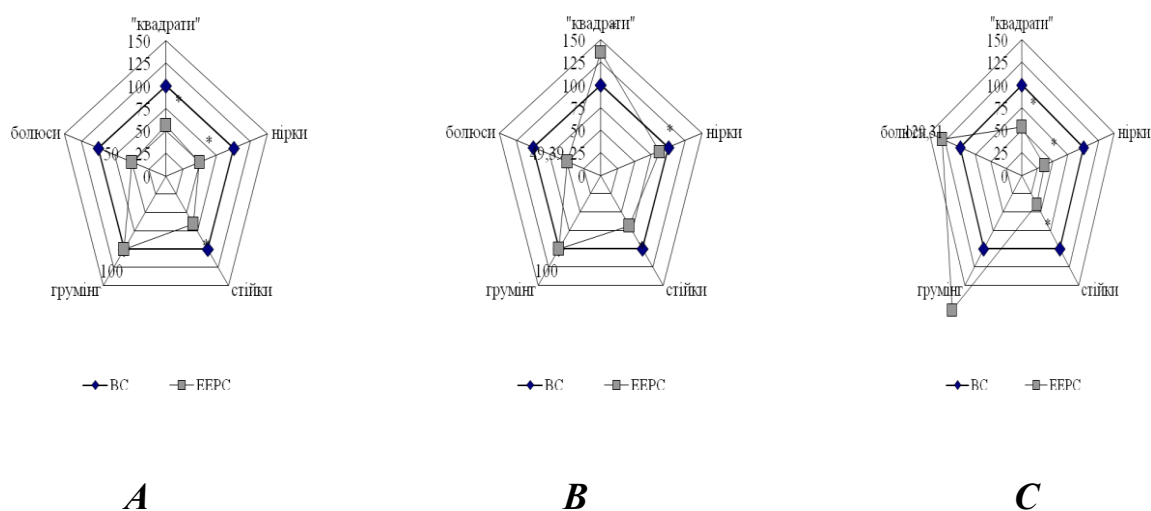


Рис. 3.4. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле»

за умов ЕАЕ

Примітки:

A – М + диклофенак;

B – М + ібупрофен;

C – М + мелоксикам.

Продемонстровано, що на фоні призначення метилпреднізолону сумісно з лорноксикамом та целекоксибом реєструвалось зменшення кількості перетнутих горизонталей на 44,8% ($p \leq 0,05$) та 46,6% ($p \leq 0,05$). Слід зазначити, що орієнтовно-дослідницька активність при введенні метилпреднізолону з целекоксибом також залишалась ослабленою, що проявлялося зменшенням епізодів заглядань у нірки на 63,4% ($p \leq 0,05$) та кількість вертикальних підйомів на 59,6% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з показниками вихідного стану (рис. 3.5). Емоційний стан тварин в даній серії експериментальних досліджень оцінювався як спокійний; статистично значимих змін показників грумінгу та болюсів дефекацій у порівнянні з показниками вихідного стану практично не спостерігалось.

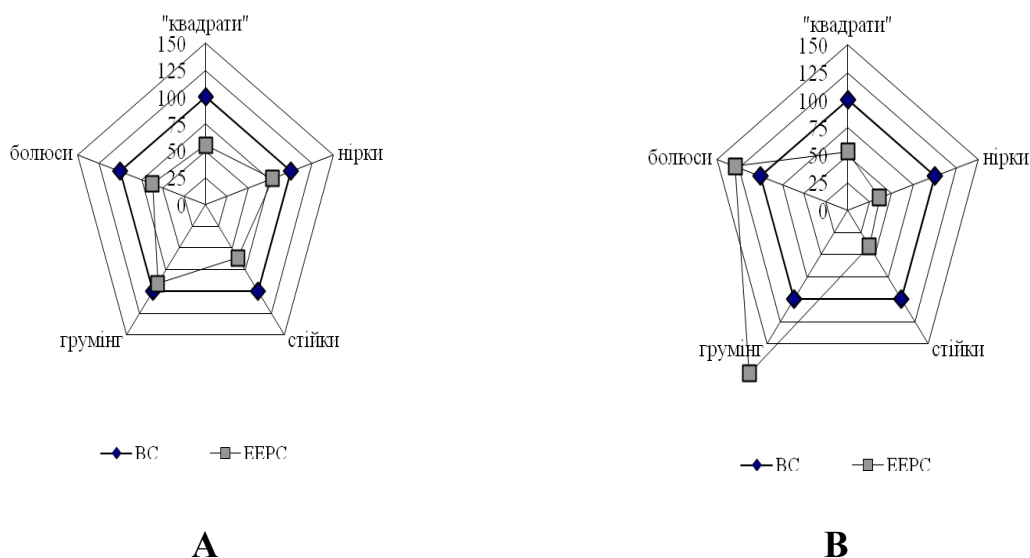


Рис. 3.5. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група М + лорноксикам;

В – група М + цефекоксиб.

Однонаправлена тенденція змін поведінки спостерігалась щодо показників орієнтовно-дослідницької активності тварин на фоні введення парацетамолу та кеторолаку на тлі 5-денної фармакотерапії метилпреднізолоном. Так, кількість заглядань у нірки була зниженою на 57,9% ($p \leq 0,05$) для групи М + парацетамол та на 52,1% ($p \leq 0,05$) для групи М + кеторолак у порівнянні з показниками вихідного стану. Після формування експериментальної моделі та наступних 5 днів введення метилпреднізолону і однократного застосування досліджуваних анальгетиків число стійок залишалось зниженим у 3,8 рази ($p \leq 0,05$) для групи М + парацетамол та у 6,2 рази ($p \leq 0,05$) для групи М + кеторолак (рис. 3.6).

Показано, що на фоні призначення композиції М + кеторолак спостерігалась більш позитивна динаміка по відновленню рухової активності: кількість перетнутих квадратів збільшилась на 88,2% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 12 добою моделювання експериментальної патології. Емоційний стан практично не змінювався: кількість актів грумінгу та болюсів коливались в межах фізіологічної норми.

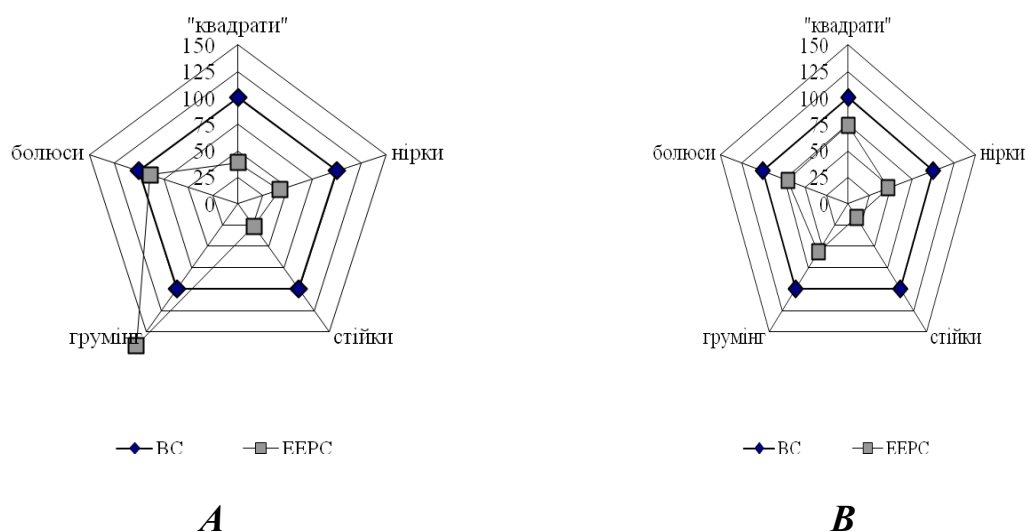


Рис. 3.6. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група М + парацетамол;

В – група М + кеторолак.

Отже, за умов ЕАЕ в тесті «відкрите поле» болезаспокійливі засоби не спроможні повністю усувати дефіцит рухової активності та відновлювати ослаблені патологією орієнтовно-дослідницькі навички у щурів. При цьому за даних умов експерименту практично не змінюються показники емоційної активності. Найбільш виражений вплив анальгетиків щодо часткової нормалізації поведінкових реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення ібупрофену, лорноксикаму та кеторолаку [128, 138, 141, 153].

3.3. Оцінка змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з болезаспокійливими засобами за умов ЕАЕ

Результатами проведених досліджень встановлено, що за умов ЕАЕ у тварин реєструвалися зміни м'язової сили як 12-ї, так і 17-ї доби формування процесів демієлінізації (табл. 3.4. та рис. 3.7).

Показано, що у вихідному стані мінімальний час, протягом якого щури висіли на пруті, зареєстрований в групі М + кеторолак ($8,25 \pm 1,25$ сек), а максимальний – в групі контролю ($12,0 \pm 2,2$ сек). При цьому на 12 добу формування ЕАЕ були зафіксовані ознаки м'язові слабкості та ослаблення рухової активності, що проявлялося зменшенням м'язової сили у 2,3 ($p \leq 0,05$) рази для груп II та IX (мінімальний показник) та у 6,2 ($p \leq 0,05$) рази для групи IV (максимальний показник).

Таблиця 3.4

Зміни м'язової сили щурів за умов модельованого ЕАЕ під впливом метилпреднізолону і його комбінацій зі знеболюючими засобами (n=10)

Дослідні засоби	М'язова сила ($M \pm m$)		
	Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
Контроль (ЕАЕ)	$12,0 \pm 2,2$	$4,5^* \pm 1,4$	$0,6^* \pm 0,7$
ЕАЕ + Метилпреднізолон (М)	$9,25 \pm 1,6$	$4,0^* \pm 1,0$	$2,7^{*\square} \pm 0,6$
ЕАЕ + М + Диклофенак натрію	$10,7 \pm 2,7$	$3,2^* \pm 0,8$	$0,9^* \pm 1,1$
ЕАЕ + М + Ібупрофен	$8,5 \pm 1,75$	$1,37^* \pm 1,12$	$2,75^{*\square} \pm 0,75$
ЕАЕ + М + Мелоксикам	$9,25 \pm 1,81$	$1,50^* \pm 1,12$	$3,12^{*\square} \pm 1,4$
ЕАЕ + М + Лорноксикам	$11,9 \pm 2,5$	$2,4^* \pm 0,8$	$3,4^{*\square} \pm 0,9$
ЕАЕ + М + Целекоксиб	$11,25 \pm 1,1$	$2,25^* \pm 0,8$	$3,7^{*\square} \pm 0,8$
ЕАЕ + М + Парацетамол	$11,6 \pm 2,7$	$4,0^* \pm 1,0$	$1,0^* \pm 1,2$
ЕАЕ + М + Кеторолак	$8,25 \pm 1,25$	$3,5^* \pm 0,9$	$3,62^{*\square} \pm 0,9$

Примітки: * - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану;

□ - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників групи контролю.

Встановлено, що на фоні 5-денного застосування метилпреднізолону та внутрішньошлункового введення мелоксикаму, лорноксикаму та целекосибу спостерігалось зростання м'язової сили на 208% ($p \leq 0,05$), 141% ($p \leq 0,05$) та 164% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками групи ЕАЕ (рис. 4.6).

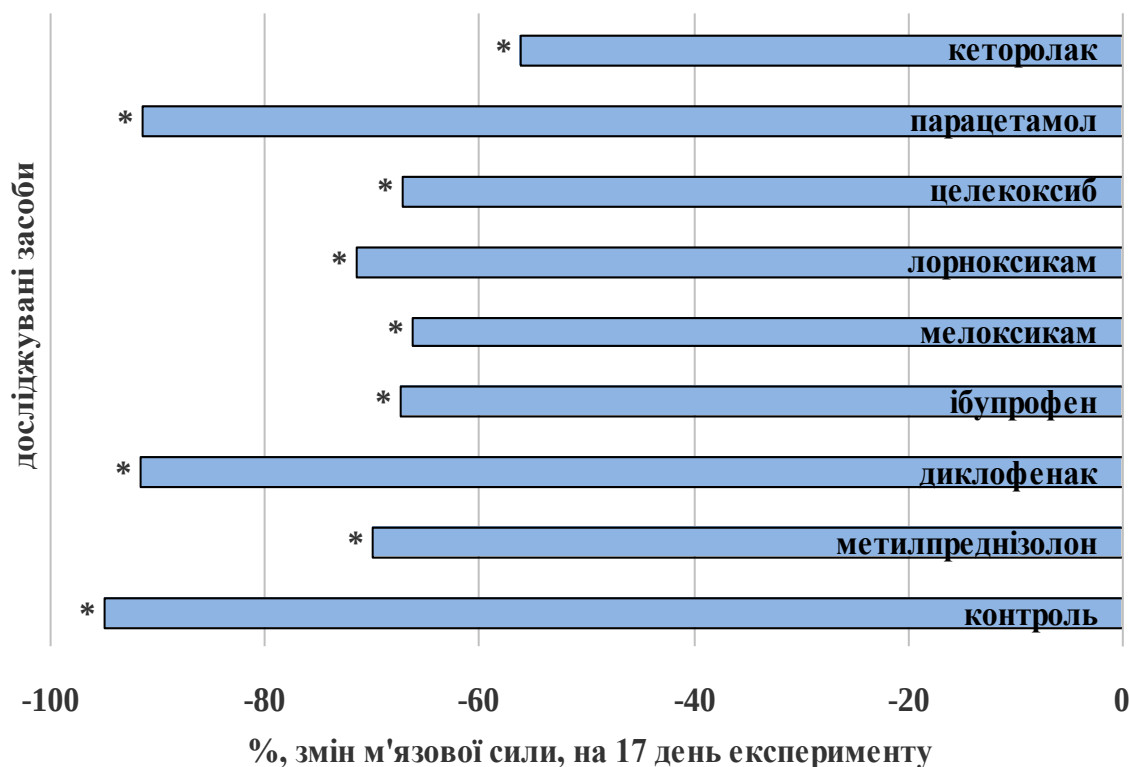


Рис 3.7. Зміни м'язової сили на фоні комбінованого введення метилпреднізолону та анальгетиків за умов ЕАЕ.

Примітка. * $p \leq 0,05$ – по відношенню до показників вихідного стану.

Отже, комбіноване введення метилпреднізолону з антиноцицептивними засобами за умов модельованої патології не здатне повністю відновлювати м'язову силу, порушену індукцією ЕАЕ. При цьому застосування мелоксикаму, целекоксибу, ібупрофену та кеторолаку статистично значимо збільшує м'язову силу у 2,7 рази у порівнянні з іншими експериментальними групами.

3.4. Вивчення нейрохімічних змін активності PGH-синтази за умов експериментального алергічного енцефаломієліту

На сьогодні етіологія розсіяного склерозу і патогенетичні механізми, що лежать в основі його розвитку і прогресування, в багатьох аспектах залишаються неясними. Проте останнім часом змінилося уявлення про саму сутність РС як захворювання, що «вражає мієлінові оболонки провідників головного і спинного мозку», при якому періоди загострень змінюються періодами повного або майже повного клінічного благополуччя [177]. В останні роки з'являється все більше даних, що свідчать про значну, якщо не провідну роль нейродегенеративних процесів в патогенезі захворювання, яке вже на ранніх етапах проявляється аксональними ушкодженнями нейродегенеративного характеру [240]. При цьому деструкція аксонів спостерігається не тільки у вогнищі демієлінізації, але і розповсюджується вдовж всього аксонального волокна [262, 290].

Тому профілактика та лікування демієлінізації, котра, в першу чергу, пов'язана з запальним процесом, є актуальною медичною та соціальною проблемою. Серед препаратів, які виявляють виражену протизапальну дію, лідером є група нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЛЗ).

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз впливу низки відомих НПЗЛЗ (диклофенак натрію, мелоксикам, ібупрофен, лорноксикам та целекоксиб) на рівень активності простагландин-синтети (PGH) в головному та спинному мозку у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу з урахуванням базової патогенетичної терапії метилпреднізолоном.

Результати дослідження визначення рівня активності PGH-синтази в структурах головного та спинного мозку представлені в таблиці 3.5.

Показано, що за умов ЕАЕ в групі контролю зареєстровано збільшення рівня РGH-синтази у 2,8 рази ($p \leq 0,05$) та у 2,6 рази ($p \leq 0,05$) у головному та спинному мозку відповідно у порівнянні з показниками інтактних тварин.

Таблиця 3.5

Рівень активності РGH- синтази в гомогенаті головного та спинного мозку у тварин з ЕАЕ, (n=10)

<i>Дослідні групи</i>	<i>РGH – синтетаза, мкмоль/хв/мг білка</i>	
	<i>Головний мозок</i>	<i>Спинний мозок</i>
Контроль (ЕАЕ)	49,2±6,9**	37,3±3,1**
ЕАЕ + Метилпреднізолон	32,9±4,3*	30,4±3,6*
ЕАЕ + М + диклофенак	24,7±2,6*	28,4±4,0*
ЕАЕ + М + целекоксиб	24,4±2,3*	24,6±1,6*
ЕАЕ + М + мелоксикам	24,1±4,2*	21,4±2,3*
ЕАЕ + М + лорноксикам'	30,9±2,1*	28,7±2,6*
ЕАЕ + М + ібупрофен	26,5±2,9*	23,9±2,1*
Інтактні тварини	17,5±2,4	14,5±1,0

Примітки: * - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками контролю;

** - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками інтактних тварин.

Встановлено, що в групі, тварини якої отримували метилпреднізолон, на закінчення експерименту зареєстроване зменшення активності РGH-синтази на 33,1% ($p \leq 0,05$) та на 18,5% ($p \geq 0,05$) в головному та спинному мозку відповідно у порівнянні з показниками групи контролю.

Загалом на фоні 5-ти денного введення метилпреднізолону сумісно з безпечними засобами продемонстроване статистично значиме зниження активності РGH-синтази як в головному, так і в спинному мозку. Так, комбіноване введення метилпреднізолону з диклофенаком натрію, целекоксибом та мелоксикамом сприяло зниженню активності РGH-синтази

в структурах головного мозку на 49,8% ($p \leq 0,05$), 50,4% ($p \leq 0,05$) та 51% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками групи контролю. Проте ці ж НПЗЛЗ менш виражено знижували активність PGH-синтази в спинному мозку: на 23,9% ($p \leq 0,05$) (М + диклофенак), на 34% ($p \leq 0,05$) (М + целекоксиб) та на 47,4% ($p \leq 0,05$) (М + мелоксикам) у порівнянні з показниками групи контролю.

В групах VI та VII також спостерігалася тенденція до зниження рівня PGH-синтази як в головному, так і спинному мозку (табл. 3.5).

Отже, 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 [134].

3.5. Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому та демієлінізуючої патології

Відомо, що успішне використання комбінованих лікарських форм обмежено можливими взаємодіями індивідуальних сполук на фізико-хімічному, фармацевтичному та біологічному рівнях (фармакологічна взаємодія) та потребує попередньої оцінки можливої взаємодії та потенційної сумісності окремих фармацевтичних інгредієнтів. Дані вимоги можна реалізувати за допомогою підходів комп'ютерного моделювання, враховуючи взаємодію як на хімічному (утворення солей, перебіг реакцій

конденсації, циклізації тощо), так і на органічному рівні з урахуванням відомих механізмів розвитку біологічної відповіді.

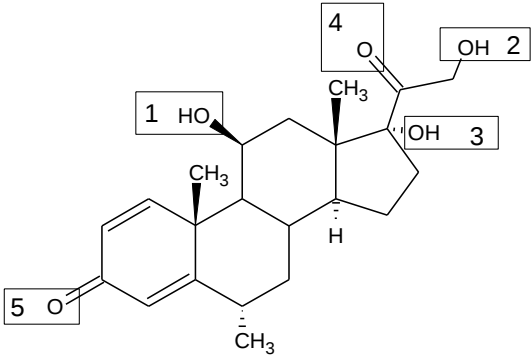
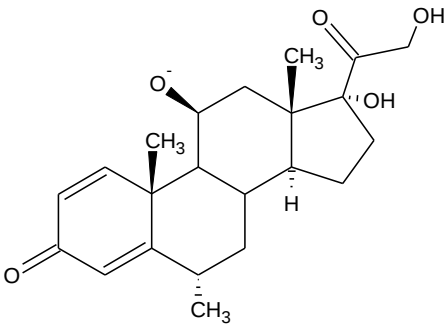
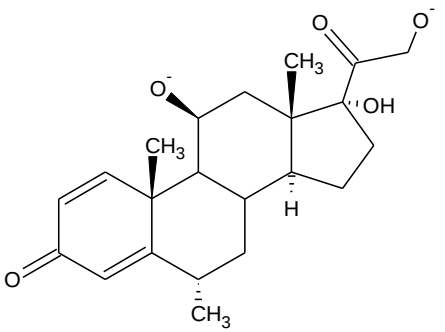
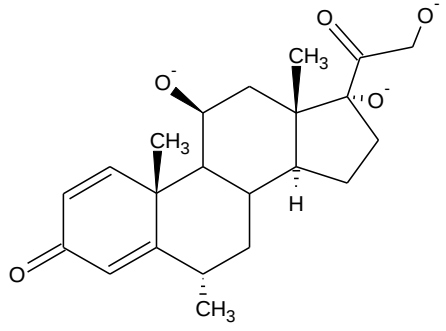
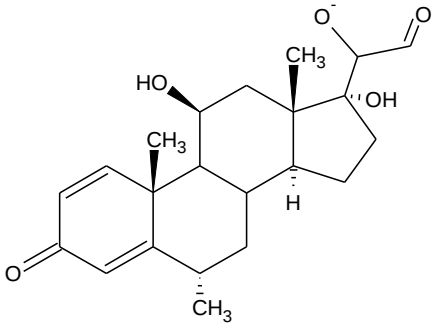
У зв'язку з цим метою роботи було прогнозування можливості комбінованого використання метилпреднізолону (як основного засобу базової терапії РС) та мелоксикаму (як ефективного болетамуючого засобу) за умов ЕАЕ.

Аналіз кислотно-лужних властивостей проводився за допомогою програми ACD / pKa DB [211]. Молекулярна маса, розчинність, ліпофільність визначалися адитивними методами з використанням комп'ютерних програм [244, 246, 306]. Типи біомішеней (рецептори, ферменти, транспортери) були визначені з використанням відповідних літературних джерел [57, 266].

Взаємодія молекул на молекулярному рівні визначається їх хімічною будовою, наявністю і реакційною здатністю певних функціональних груп. Враховуючи провідний характер електростатичної взаємодії (формування дисоціюючих солей / цвіттеріонів форм, протонування / депротонування в лімітуючих стадіях таутомірних перетворень тощо). Утворення катіонних / аніонних форм, залежне від умов рН середовища, слід визнати одним з провідних факторів, що обумовлюють можливість взаємодії розглянутих комбінаторних з'єднань.

В подальшому проведений аналіз функціональних груп та реакційної спроможності дослідних сполук. Так, у молекулі метилпреднізолону присутні п'ять потенційних функціональних груп - три гідроксильні (1-3) і дві карбонільні (4,5), що припускає можливість його протонування / депротонування і кислотно-лужні властивості. Рухливість протона зазначених гідроксильних груп, а також здатність до таутометрії сумарно припускають наявність існування п'яти протолітичних форм (табл. 3.6).

Структурна формула, функціональні групи та протолітичні форми метилпреднізолону

 Форма [BH₄]	
 Форма BH₂⁻	 Форма BH⁻
 Форма B³⁻	 Форма (таутомер) BH₂⁻

Високі значення констант іонізації наведених форм (табл. 3.7) вказують на переважне знаходження в неіонізованому вигляді, що відбивається на таких фізико-хімічних характеристиках, як коефіцієнти розподілу в системах, що містять гідрофільні і ліпофільні фази. Так, для неіонізованої форми (BH₃) величина ліпофільності (logP) становить $1,99 \pm 0,54$, в результаті чого розрахована розчинність у воді, яка є найнижчою з усіх можливих

протолітичних форм (0,13 г / л). Збільшення рН середовища і послідовне утворення заряджених форм (депротонування) призводять до збільшення гідрофільності молекули (внаслідок збільшення заряду і площі полярної поверхні, Å²), підвищенню розчинності у воді і пониженню величини logD (табл. 3.7) за рахунок збільшення кількості груп - акцепторів протонів.

Таблиця 3.7

Фізико-хімічні та кислотно-лужні властивості метилпреднізолону

	BH_2^-	BH^{2-}	(таутомер) BH_2^-	B^{3-}	BH_3
pKa	14,59±0,7	12,98±0,1	12,48±0,7	13,14±0,2	-
Розчинність, г/л (25 °C)	60,4	1,01	0,31	1,4	0,13
logD (logP)	-0,69	1,08	1,6	0,47	1,99±0,54
Кількість донорів протону	0	1	2	3	3
Кількість акцепторів протону	5	6	7	8	9

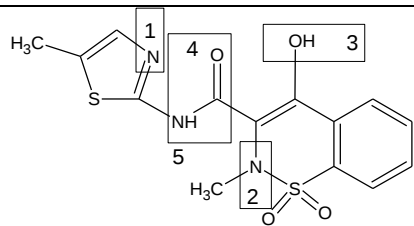
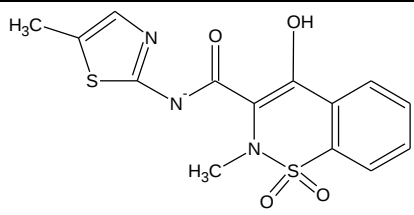
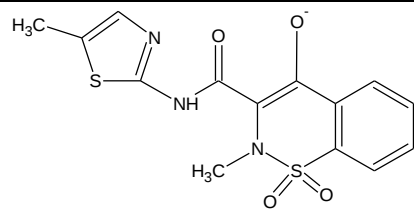
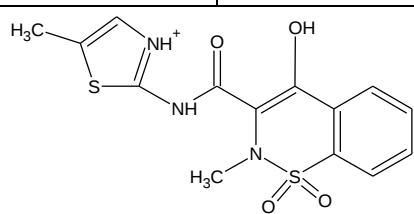
Слід зазначити, що розглянуті гідроксильні групи характеризуються слабкою кислотністю - величини pKa для них знаходяться вище 11, що обумовлено відсутністю суттєвих негативних індукційних ефектів та низькою рухливістю відповідних гідроксильних протонів. Як було зазначено раніше, для метилпреднізолону можлива таутомерія, що приводить до утворення потенційної протолітичної форми BH_2^- (табл. 3.7); проте кислотність гідроксилу, що утворюється, статистично недостовірно відрізняється від величин pKa інших гідроксильних груп. Можливість до таутомерії карбонільної групи в положенні 3 прегнанового скелету дуже низька, оскільки цей процес пов'язаний зі стеричними труднощами при переході від конформації «крісла» цієї частини молекули до планарної ароматичної структури.

У молекулі мелоксикаму можна виділити п'ять потенційно реакційно здатних груп, в яких процеси протонування / депротонування можуть

протікати по чотирьох - віцінальному гідроксилу циклічної структури (група 3) і атомах азоту (групи 1, 2 і 5). Крім того, рухливий протон гідроксилу (група 3) припускає наявність таутомерної рівноваги, яке, втім, зрушено в бік утворення більш кислого фенольного гідроксилу ($pK_a\ 4,5 \pm 1,0$) (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Структура формула, функціональні групи та протолітичні форми мелоксикаму

 Форма BH_2	
 Форма BH^-	 Форма BH^{2-}
 Форма BH^{3+}	

Амідний азот в молекулі мелоксикаму більш рухливий внаслідок близького розташування сполучених електронних структур (тіазолове кільце, карбоніл і подвійний зв'язок бензотіазинового скелету), тому депротонування його можливе вже при рН нижче 11 ($pK_a = 10,79 \pm 0,2$). Лужність атома азоту тіазолового кільця вельми знижена за рахунок утворення сполученої структури, тому його протонування здійснюється тільки при значеннях рН нижче 3,0 (табл. 3.9). Здатність до утворення

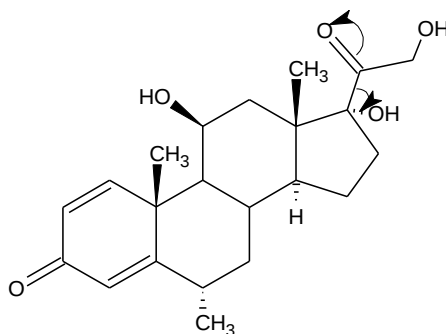
гідрофільних сполук призводить до того, що найбільша розчинність у воді відзначається для форми BH^- , приводячи разом з тим до зменшення ступеня розподілу в системі «октанол-вода» ($\log D = 1,06$). Протонування сульфамідного азоту протікає при дуже низьких значеннях рН внаслідок сильного негативного індукційного і мезомерного ефектів сульфатної групи, тому реакції даної групи не розглядалися.

Таблиця 3.9

**Фізико-хімічні властивості та кислотно-лужні властивості
мелоксикаму**

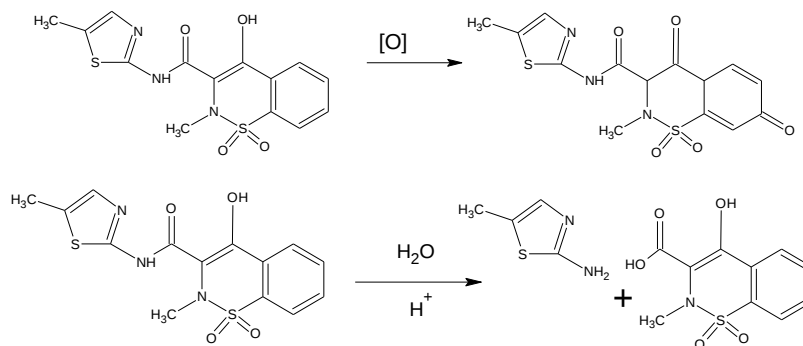
	BH_2	BH^-	BH^{2-}	B^{3+}
pK_a	-	$10,79 \pm 0,2$	$4,5 \pm 1,0$	$3,05 \pm 0,5$
Розчинність, г/л (25 °C)	0,082	1,77	0,14	0,11
$\log D$ ($\log P$)	2.71	-1.06	2.39	2.41
Кількість донорів протону	2	1	0	0
Кількість акцепторів протону	6	6	7	8

Наступним важливим етапом фармакокінетичного аспекту використання метилпреднізолону та мелоксикаму став аналіз хімічних властивостей та можливої взаємодії. Гідроксильні групи в молекулі метилпреднізолону, як показано з розрахованих величин pK_a , мають слабку кислотність, тому можливість протікання реакцій алкілування по них (припускаючи їх участь в реакціях нуклеофільного заміщення в якості алкоксиліруючих агентів) слід визнати мінімальною. Однак можливим є участь метилпреднізолону в реакціях нуклеофільного приєднання по карбонільній зв'язку аліфатичного заступника прегнанового кільця (положення 17):



Навпаки, порівняно рухливий протон гідроксилу в молекулі мелоксикаму припускає можливість участі в реакціях як алкілювання, так і ацилювання. Однак метилпреднізолон в цих умовах, як було зазначено вище, не формує активних заряджених форм, у зазначеному інтервалі рН виявляє низьку розчинність у воді (полярний розчинник), тому цей тип взаємодії між ними також слід вважати малоімовірним.

Виходячи з величин рКа мелоксикаму і метил преднізолону, також не слід очікувати реакцій протонування по атомах азоту, оскільки розглянуті протолітичні форми метилпреднізолону утворюються при високих значеннях рН.



Наявність у молекулі мелоксикаму гідроксильної групи дає можливість припустити протікання реакцій окислення з утворенням хіноїдної форми, а також каталізованого кислотного (за рахунок дисоціації кислої гідроксильної групи і генерації протона) гідролізу амідної групи.

Фармакологічний тип взаємодії реалізується переважно через однакові (або пересічні) механізми дії, вплив на однакові рецепторні системи, пригнічення / індукцію синтезу ферментів, що регулюють метаболічні реакції. У зв'язку з цим необхідним є розгляд механізмів дії даних сполук.

Метилпреднізолон взаємодіє зі специфічними цитоплазматичними рецепторами, стимулює синтез специфічних мРНК та призводить до утворення ліпокортину, який гальмує активність фосфоліпази А2 і пригнічує вивільнення простагландинів, ендоперекисів, лейкотрієнів (фактори запалення). Пригнічує вивільнення циклооксигенази (ЦОГ), головним чином ЦОГ-2. Знижує проникність капілярів, викликає стабілізацію мембран і зменшення виділення протеолітичних ферментів. У високих дозах метилпреднізолон може підвищувати збудливість тканин мозку і сприяє зниженню порогу судомної готовності. Протишокову і антитоксичну дію пов'язують з підвищенням артеріального тиску (за рахунок збільшення концентрації циркулюючих катехоламінів та відновлення чутливості до них адренорецепторів, а також вазоконстрикції), зниженням проникності судинної стінки, мембранопротекторними властивостями, активацією ферментів печінки, що беруть участь у метаболізмі ендо- та ксенобіотиків. Стимулює надлишкову продукцію соляної кислоти і пепсину в шлунку.

В свою чергу, механізм дії мелоксикаму полягає в інгібуванні синтезу простагландинів внаслідок вибіркового пригнічення ферментативної активності ЦОГ-2. При призначенні у високих дозах, тривалому застосуванні та індивідуальних особливостях організму селективність ЦОГ-2 знижується. Пригнічує синтез Рg в області запалення більшою мірою, ніж у слизовій оболонці шлунка або нирках, що пов'язано з відносно вибіркоvim інгібуванням ЦОГ-2. Рідше викликає ерозивно-виразкові захворювання шлунково-кишкового тракту.

Таким чином, виходячи з вищевикладеного, можна зробити висновок, що в представленій 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 [123, 156].

3.6. Оцінка ультраструктурних змін деяких утворень мозку на фоні введення неопіїдних анальгетиків за умов ЕАЕ

Розсіяний склероз відноситься до демієлінізуючих захворювань нервової системи, при яких основні патоморфологічні зміни розвиваються в білій речовині і характеризуються розпадом мієлінових оболонок провідникових систем в різних відділах головного та спинного мозку. Найбільш часто вони локалізуються в бічних і задніх стовпах спинного мозку, в області моста, мозочку і зорових нервах. Уражаються, головним чином, еволюційно молоді нервові структури - пірамідні провідники, задні стовпи спинного мозку, волокна зорового нерва. Навколо вогнищ демієлінізації і аксональної дегенерації, які є основними патоморфологічними змінами при розсіяному склерозі, виявляється перифокальний набряк мозкової речовини, в розвитку якого грають роль медіатори запалення, а також судинні реакції [264, 315]. Мультифокальна демієлінізація при розсіяному склерозі є правилом, однак питання про найбільш ранні зміни, що передують демієлінізації, залишається дискусійним. Патоморфологічні зміни при РС проходять три стадії розвитку. Перша стадія - вогнищевий розпад мієліну, оголення осевого циліндру на тлі помірного набряку і гіперемії нервової тканини; друга - очищення дефекту від продуктів розпаду мієліну гліальними і плазматичними клітинами. Протягом перших двох стадій порушується

провідність нервових імпульсів по аксонах, що визначає розвиток в клінічній картині тих чи інших патологічних симптомів. Третя стадія полягає в склерозуванні дефекту мієлінової оболонки за рахунок проліферації гліальних елементів - астроцитів і гістіоцитів. З плином часу процес розпаду і склерозу поширюється з оболонок на осьовий циліндр, що обумовлює поступове поглиблення патологічних симптомів [312, 315]. В основі подібних змін лежить каскад імунопатологічних реакцій, що призводять до руйнування мієліну в гострій стадії процесу і формування вогнищ склерозу при хронічному перебігу захворювання [247, 321]. З урахуванням сучасних уявлень про патогенетичні механізми розвитку мультифокальної демієлінізації при розсіяному склерозі, в даному розділі представлені результати власних експериментальних досліджень змін ультраструктури утворень мозку під дією знеболювальної терапії та засобів медикаментозної захисту мозку на тлі гормональної терапії метилпреднізолоном в умовах експериментального алергічного енцефаломієліту.

3.6.1. Характеристика ультраструктурних змін фронтальної кори та гіпокампу при формуванні експериментального алергічного енцефаломієліту

Як показали результати аналізу ультрамікроскопічного дослідження в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту, цитоархітектоніка фронтальної кори в цілому збережена. Спостерігається помірна кількість апоптотично змінених нейроцитів 2-го і 3-го шарів кори, у пірамідних нейронах ядра деформовані, цитоплазма насичена канальцями і цистернами комплексу Гольджі. В нейронах виявляється значна кількість аутофаголізосом, що містять ліпопротеїнові включення (рис. 3.8).

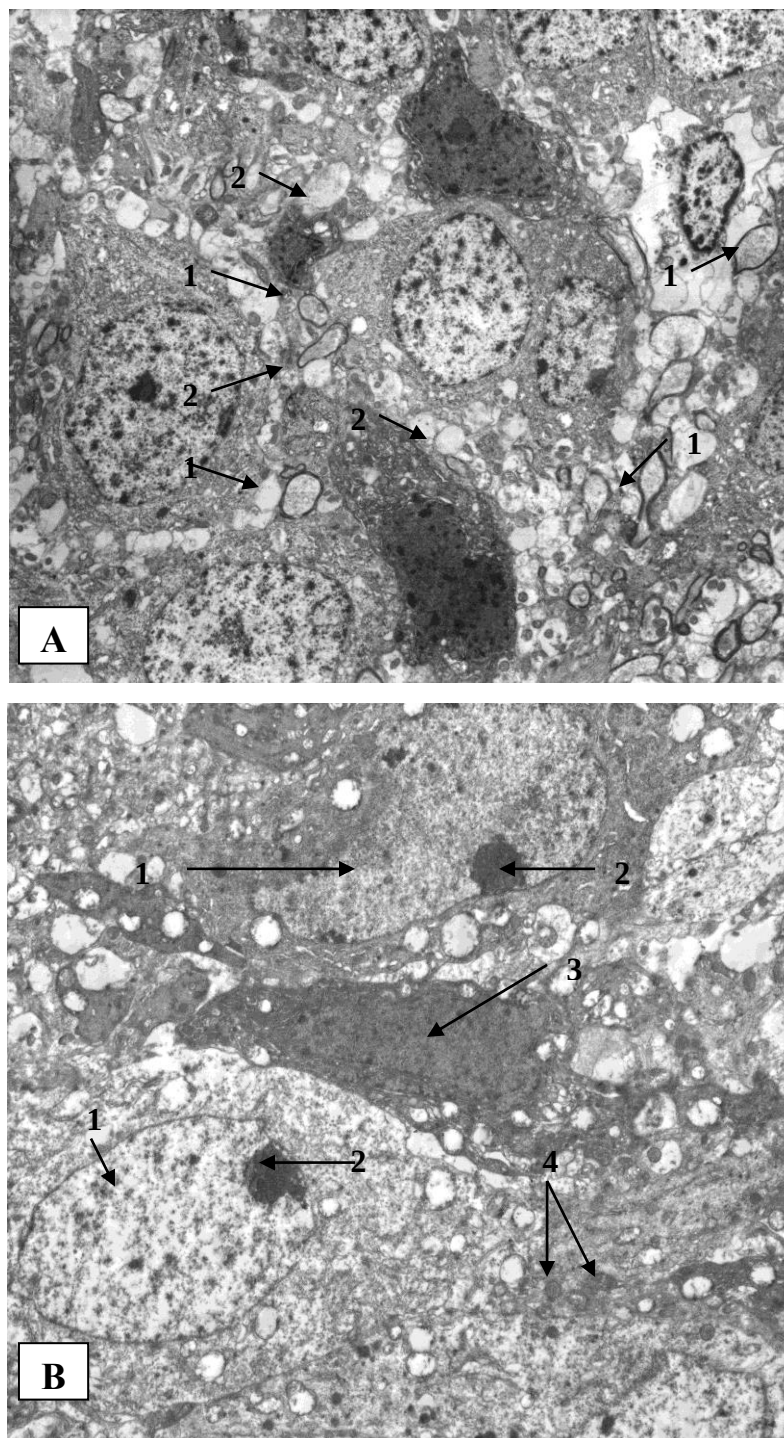


Рис. 3.8. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту. 36.x 4000 (А), 36.x 5000 (В).

Позначення:

- А: 1.мієлінові волокна з помірним руйнуванням нейрофібрил;
2.безмієлінові волокна.
- В: 1.протоплазматичні астроцити;
2.ядро астроцита;
3.цитоплазма нейрона;
4.мітохондрії.

Канальці гранулярного ендоплазматичного ретикулума (ЕПР) дезорганізовані і гомогенізовані, агранулярного - розширені. Зустрічаються фрагментовані відростки нейронів. В даній експериментальній групі навколо нейронів визначались значні ділянки набряку. Перінейрональний набряк фронтальної кори має дисемінований характер та спостерігається порушення структури більшості аксо-соматичних синапсів. На зрізах виявлено поруч зі збереженою мієліновою оболонкою, також ділянки з локальною руйнацією мієліну та нейрофібрил (рис. 3.8, рис. 3.12).

Відростки астроцитів, прилеглі до стінок гемокапілярів, мають розширені профілі і частково лізіровану цитоплазму, у деяких із них - скупчення аутофаголізосом, фрагменти пошкодженого шорсткого ендоплазматичного ретикулуму. Плазматична мембрана, що обмежує астроцитарні відростки, виявляється безперервною, розпушеною, набряклого. На зрізах кори фронтальної долі в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту часто виявляються клітинні скупчення астроцитів з мікрогліоцитами. Мікрогліальні клітини мають амебоїдну форму, з цитоплазмою підвищеної електронної щільності за рахунок гіпертрофованого комплексу Гольджі, значних розмірів аутофаголізосом і щільних мітохондрій. В полі зору багато мітохондрій - з розмитими профілями і ознаками кристалізації (рис. 3.9). Гіалоплазма насичена рибосомами, полісомами, розширеними елементами агранулярного ЕПР. Ядра з високим вмістом еухроматину. На відстані від гемокапілярів зазвичай виявляються олігодендроцити з частково лізірованою цитоплазмою. Нами виявлені патологічні зміни в олігодендроцитах, а саме - у складі ядер периферичні ділянки хроматину мають нечіткі контури і представлені гомогенними масами, що вказують на початкові стадії каріолізису.

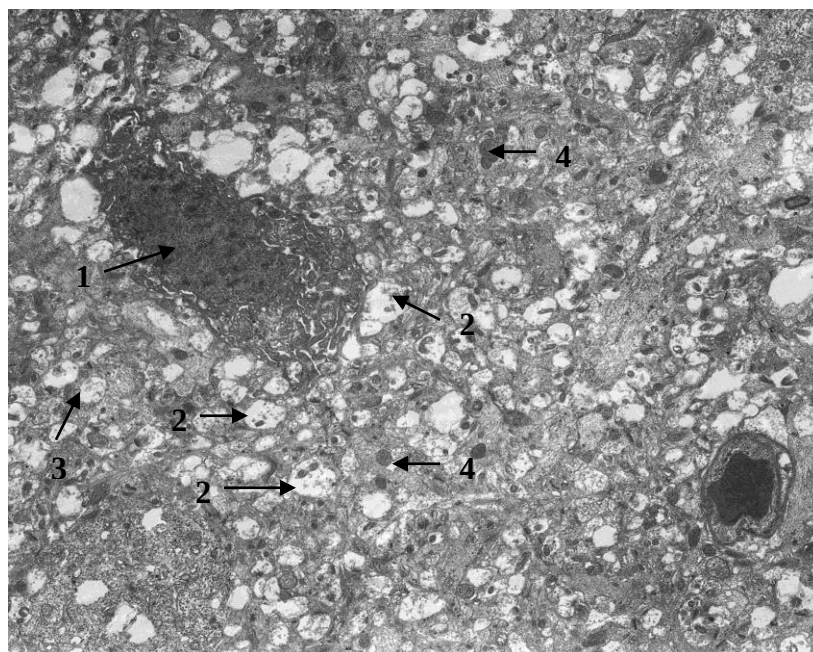


Рис. 3.9. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту. 36.х 5000.

Позначення:

1. цитоплазма нейрона;
2. нервові волокна;
3. нейрофібрили;
4. мітохондрії.

Відростки астроцитів і олігодендроцитів в своїй цитоплазмі містять гранули ліпопротеїнів і мають розпушені або розшаровані плазматичні мембрани (рис. 3.10). Дезорганізованими в переважній більшості випадків виявляються мієлінізовані волокна, їх аксоплазма вміщує коагуляти, ділянки лізису, завитки мезаксонів зливаються між собою у вигляді різних за формою і розмірами гомогенних мас. Багато волокон демієлінізованих, з ознаками фрагментації нейрофібрил. Більшість локусів демієлінізації волокон розташовані поблизу мікросудин.

При моделюванні експериментального алергічного енцефаломієліту просвіти гемокапілярів фронтальної кори головного мозку звужені і деформовані, містять значні скупчення пластівцеподібний мас плазми крові підвищеної електронної щільності або дезорганізовані еритроцити.

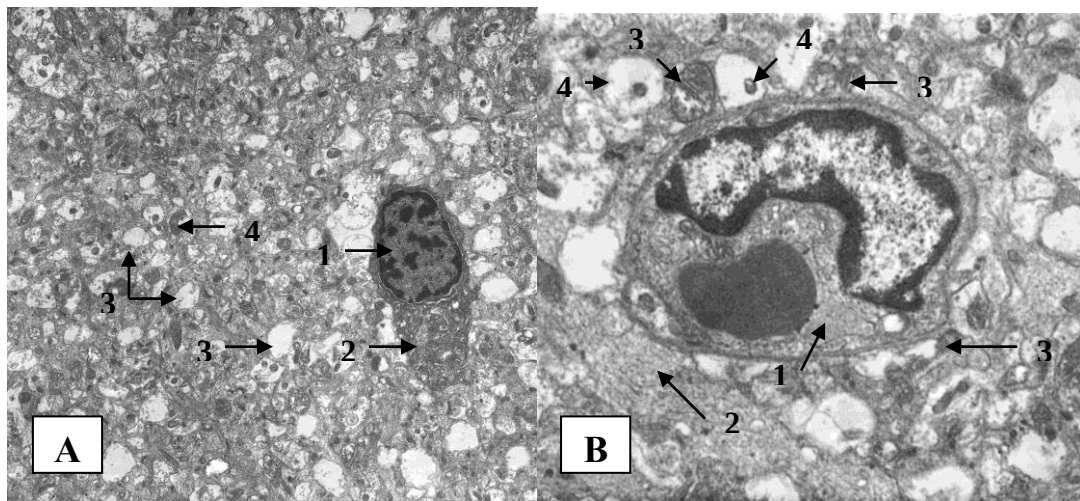


Рис. 3.10. Електронограми зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту. А - зб.х 6000; В- зб. х 16000.

Позначення:

А: 1.ядро нейрона;

2.хроматофільна субстанція цитоплазми;

3.безмієлінові нервові волокна з відсутністю нейрофіламентів;

4. ушкоджена мітохондрія.

В: 1.ядро нейрона;

2.цитоплазма нейрона;

3.мітохондрії;

4.аксони.

У більшості спостережень в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту плазматичні мембрани еритроцитів - з істотними пошкодженнями, розпушені. Як правило, еритроцити своїми розпушеними поверхнями знаходяться в тісному взаємозв'язку з дезорганізованими частинами люмінальної поверхні ендотеліальних клітин. У цих ділянках цитоплазма ендотеліальних клітин витончена, насичена осміофільними гомогенними масами.

Перицити в безпосередній близькості до описаних ділянок ендотеліальних клітин мають знижену електронну щільність і своїми пошкодженими кортикальними шарами об'єднані з гомогенними масами потовщених і розпушених базальних мембран. Цитоплазма ендотеліальних клітин в зоні органел зберігає типову для неї структуру, однак більшість

ділянок люмінальної і базальної частин плазматичної мембрани розпушені. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів виявляється хвилеподібної форми рельєф зі значними інвагінаціями в формі кавеол, що заповнені електроннощільним матеріалом гомогенної консистенції. У деяких випадках люмінальна поверхня ендотелію утворює значну кількість мікроворсинок, що вказує на наявність циркуляторної гіпоксії. Цитоплазма базальної частини ендотеліальних клітин містить нечіткі профілі одиничних мітохондрій і рибосом. Плазматична мембрана в даних ділянках не виявляється і разом з базальною мембраною утворює високої електронної щільності гомогенний матеріал. Ядра таких ендотеліальних клітин збільшені, наповнені значною масою гетерохроматина, містять дезорганізовані ядерце, мембрани каріотеки по периметру ядра мають локуси розпушення. Навколо артеріол і венул спостерігаються великі зони периваскулярного набряку. Дослідження виявило, що при моделюванні експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів у корі фронтальної долі мозку просвіти посткапілярних венул нерівномірно розширені, повнокровні, з проявами стазу формених елементів, а також ознаками лімфоїдної периваскулярної інфільтрації. Дрібні інфільтрати розподілені в тканині кори дифузно і часто містять мікрогліоцити.

Порушення ультраструктури нейронів гіпокампу головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту мають дифузний характер. Частина нейроцитів - з ознаками некробіотичних змін або в стані апоптозу, деякі нейроцити містять деформовані ядра з ознаками різко або помірно обмеженої функціональної активності, фрагментовану нуклеолемму. У перікаріоні - вакуолярно-літичне пошкодження органел, у нейронах з явищами хроматолізу - набухання і вакуолізація цистерн пластинчастого апарату, часто з деформацією цистерн і їх фрагментацією (рис. 3.11). Поблизу - підвищена кількість лізосом різного ступеня зрілості, мультивезикулярних тілець і дрібних осміофільних

включень. В ендоплазматичному ретикулі спостерігається масивне утворення вакуоле-подібних цистерн.

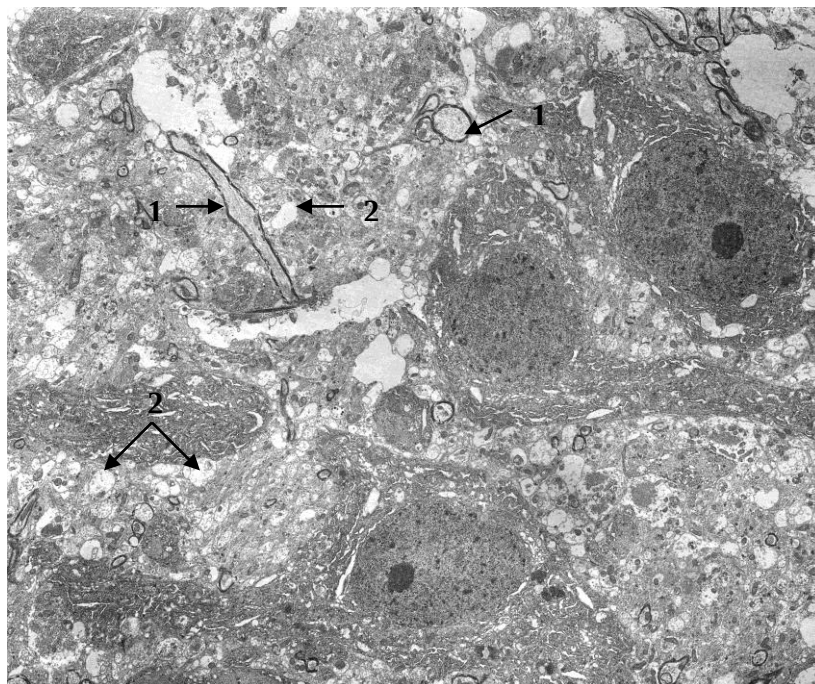


Рис. 3.11. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту. Зб.х 3000.

Позначення:

1. мієлінові волокна;
2. безмієлінові волокна.

Як показали результати дослідження, гіпокамп головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту містить багато нейронів, що мають ознаки тигролізу і внутрішньоклітинного набряку. Структура мітохондрій в нейроцитах з помірним ушкодженням порушена по вакуолярно-літичному типу, при цьому значна кількість мітохондрій збільшені в розмірах, мають фрагментовану зовнішню мембрану, зруйновані кристи і електронно-прозорий матрикс. Іноді зустрічаються мітохондрії гігантських розмірів за рахунок різкого ступеню набряку матриксу, а незначна частина мітохондрій - з відносно збереженими кристами, невеликих розмірів. Характерно особливістю даної групи експериментальних досліджень є наявність в нейронах мікромітохондрій з

гетероморфною структурою: частина з них містить стабільні мембрани в складі крист, інша частина - електронно-щільні включення на тлі щільного матриксу. Відзначається різка фрагментація нейрофібрил.

Цитоплазма і ядра астроцитів - помірної електронної щільності, зі зменшенням наповнення ендоплазматичним ретикуломом гранулярного типу, рибосомами, полісомами, мітохондріями з ознаками кристоліза, дрібнозернистої гіалоплазми. Канальці агранулярного ЕПР розширені і частково заповнені електроннощільними масами неоднорідною консистенції. Відростки астроцитів наповнені дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами, мітохондріями.

Між окремими астроцитарними відростками виявляється тонкий електронно-світлий шар основної речовини сполучної тканини. Цитоплазма олігодендроцитів - електронно-прозора і збіднена цитоплазматичними органелами, хоча окремі ділянки їх містять поодинокі мітохондрії і групи канальців ендоплазматичної сітки. Ядра містять помірну кількість еухроматину (рис. 3.12). Зовнішня ядерна мембрана часто утворює трубочки великого діаметра, які простягаються в цитоплазму.

У більшості мієлінових нервових волокон відсутня характерна нейрофіламентозна організація відростків нейронів, мітохондрії не виявляються. Аксоплазма містить великі за обсягом коагуляти і ділянки лізису, аксолема часто фрагментована, набрякла, на значному протязі відокремлена від внутрішньої поверхні мієлінової оболонки та має різної ширини щілиноподібні простори. Дегенеративні зміни мієлінізованих відростків в гіпокампі щурів, що входили в групу моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту, мають мозаїчний характер, а безмієлінові нервові волокна - без патологічних змін (рис. 3.12).

Демієлінізація волокон представлена в різних морфологічних варіантах. Зокрема, більшість волокон мають мієлінову оболонку з великими ділянками оточених мембран, що містять розпушені волокна, в ряді випадків з порушеною цілісністю. Поблизу оболонки нерідко виявляються

концентричні скупчення мембранного матеріалу. Периферія мієлінових оболонок містить різко ущільнений осміофільний матеріал по більшій частині поверхні, деякі волокна в складі мієлінових оболонок мають численні дрібні округлі мембранні утворення, рівномірно розподілені по окружності поперечних зрізів волокон. У даних утвореннях волокна мембрани мають різко підвищену електронну щільність і, як правило, оточені скупченнями дрібних щільних гранул. Як показали результати експерименту, в даній групі дослідних тварин, переважає дисимінована периаksonальна демієлінізація.

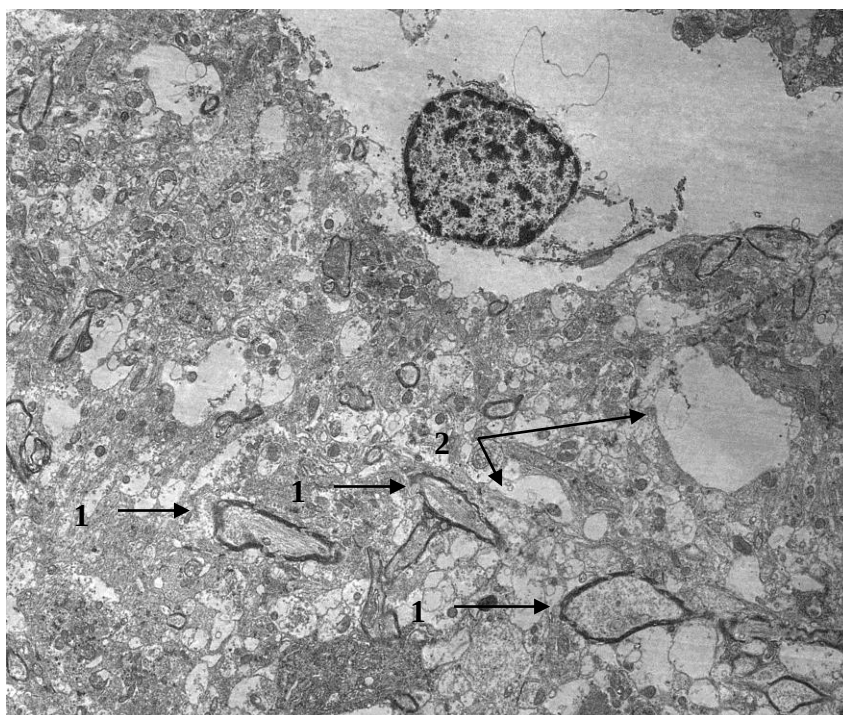


Рис. 3.12. Електронограма зрізу гіпокампі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту.

36.x 5000.

Позначення:

1. мієлінові волокна з частковим (локальним) розшаруванням мієліну;
2. безмієлінові волокна.

Просвіти гемокапілярів звужені, в плазмі крові - дифузно розташовані електроннощільні пухкі маси або деформовані еритроцити. Цитоплазма ендотеліальних клітин має середню електронну щільність, розвинені каналці, цистерни, мікровезикули, первинні лізосоми комплексу Гольджі. У ділянках цитоплазми, що прилягає до каріотеки, виявляються в значних

кількостях рибосоми, полісоми і мітохондрії дуже малих розмірів, часто мітохондріальні мембрани - без чітких контурів, розпушені. Ядра артеріол і венул - неправильної форми, заповнені переважно гетерохроматином. У деяких випадках периферичні ділянки ядер утворюють значну кількість куполоподібних випинань в формі передапоптитичних тілець. Зовнішня і внутрішня мембрани каріотеки в таких ділянках втрачають чіткі профілі. Цитоплазма ендотеліальних клітин поблизу базальної мембрани мікросудин містить значну кількість міковезикул, які часто знаходяться в контакті з плазмолемою. Між чітко оконтурованою базальною мембраною гемокапілярів і ділянками плазматичної мембрани базальної частини цитоплазми ендотеліальних клітин виявляється вузьким електронно-світлим прошарком субендотеліальний шар. Перицити в складі стінок венул часто мають ознаки некробіотичних змін. Навколо венул спостерігаються значні за площею ділянки периваскулярного набряку, просвіти - з проявами стазу, значна лімфоїдна периваскулярна інфільтрація, що має дифузний характер.

Таким чином, застосування електронномікроскопічного дослідження дозволило виявити ряд суттєвих морфологічних порушень в будові кори фронтальної долі та гіпокампу головного мозку дослідних тварин в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту.

3.6.2. Динаміка змін цитоархітектоніки деяких утворень головного мозку лабораторних щурів за умов ЕАЕ під впливом інтраперитонеального введення метилпреднізолону

Як показали електронограми зрізів головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з введенням метилпреднізолону загальна цитоархітектоніка кори не порушена. Для нейронів кори фронтальної долі головного мозку характерна присутність в них кулястої форми ядра, заповненого майже однорідними масами еухроматину і помірною кількістю конденсованого хроматину. Ядерце без

суттєвих патологічних ознак, значних розмірів, структуроване на фібрилярні центри, фібрилярний і гранулярний компоненти. Цитоплазма нейронів – помірної електронної щільності, з дрібнозернистою гіалоплазмою, помірною кількістю рибосом і зниженою кількістю полісом, елементи гранулярного ендоплазматичного ретикулуму без значних змін.

Цитоплазма ендотеліоцитів має типову будову, проте зустрічаються розпушені ділянки люмінальної і базальної зон плазматичної мембрани. Рельєф люмінальної поверхні має численні інвагінації з кавеолами, які заповнені гомогенним вмістом підвищеної електронної щільності (рис. 3.13).

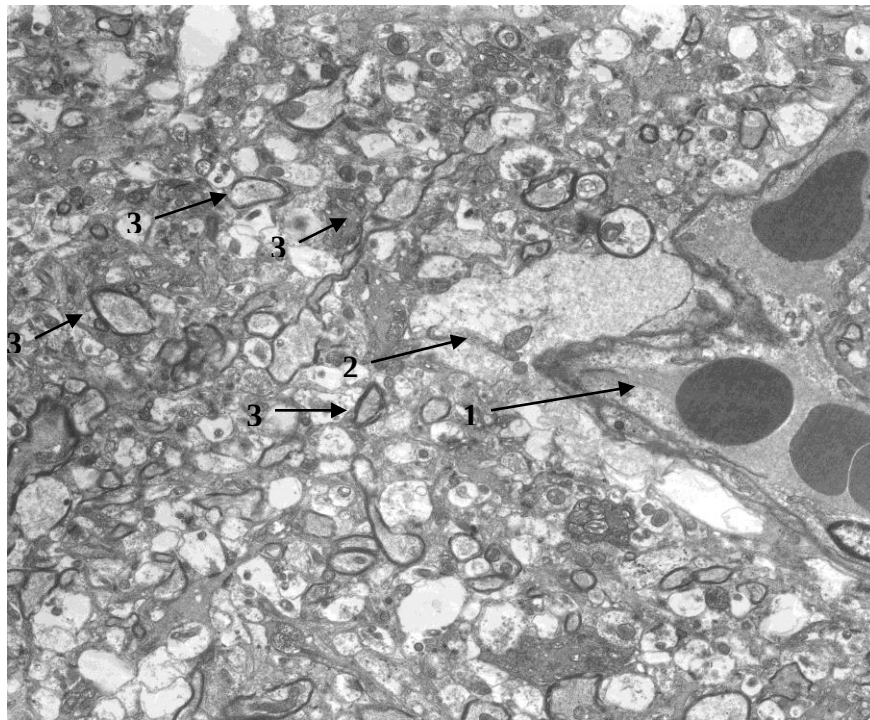


Рис. 3.13. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном. 36.х 5000.

Позначення:

1. просвіт гемокапіляру з форменими елементами крові;
2. мітохондрії;
3. мієлінові нервові волокна з нейрофібрилами.

На ультрамікроскопічному рівні визначались мітохондрії невеликі за діаметром, які містять помірну кількість крист, мітохондріальний матрикс з

дещо зниженою електронною щільністю. В нейронах кори даної експериментальної групи відзначається підвищений вміст каналців агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, одиничних аутофаголізосом. Плазматична мембрана нейронів в більшості випадків має чіткий контур, явища перинейронального набряку і апоптотично змінених нейроцитів зустрічаються в одиничних випадках, що свідчить на користь компенсаторної дії метилпреднизолону на стан нейронів кори головного мозку при експериментальному алергічному енцефаломієліті.

Олігодендроцити характеризуються високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. Ядра цих клітин овоїдної форми, заповнені однорідними масами еухроматину, які по периферії обмежені каріотекою. Кількість гетерохроматину поступається деконденсованому. В електронно-прозорій цитоплазмі клітин виявляється значна кількість рибосом, полісом, мітохондрій, плазматична мембрана зазначених олігодендроцитів у деяких ділянках розпушена. Астроцити зустрічаються в підвищеній кількості, частина з них мають порушені внутрішньоклітинні органели. Ступінь набряку цитоплазми нейронів значно нижче, ніж в групі з моделюванням експериментального алергічного енцефаломієліту. Клітинні скупчення астроцитів з мікрогліоцитами поодинокі, функціональна активність мікрогліальних клітин на помірному рівні (рис. 3.14).

Аналіз досліджень кори фронтальної долі мозку дослідних тварин на ультраструктурному рівні продемонстрував, що мієлінізовані волокна поблизу нейронів мають розширений діаметр, в їх аксоплазмі виявляються значної довжини мітохондрії і нейрофіламенти. Завитки мезаксона мієлінізованих волокон на більшості ділянок розпушені, але зберігають свою структурну цілісність і паралельну взаємну орієнтацію.

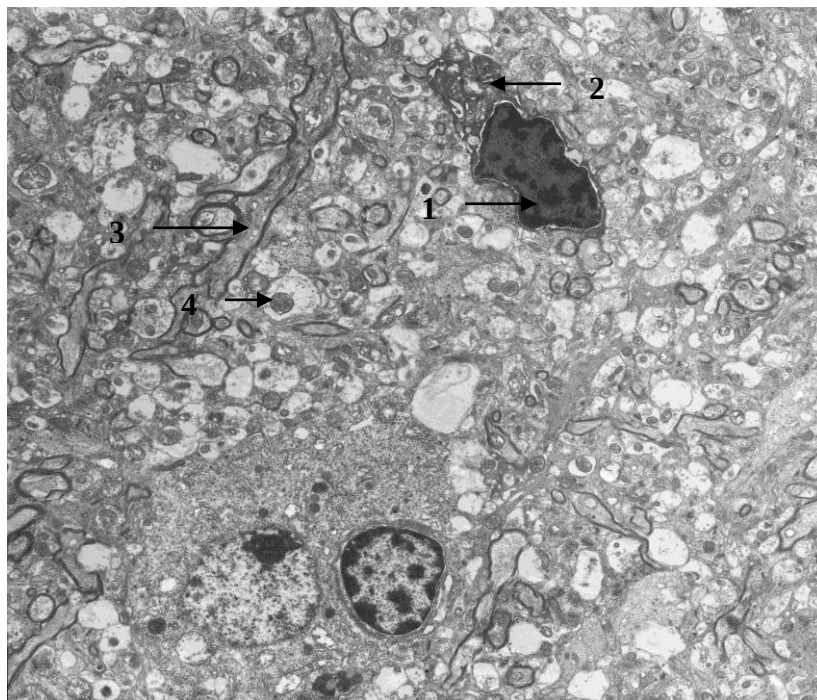


Рис. 3.14. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном. 3б.х 5000.

Позначення:

1. ядро нейрона;
2. цитоплазма нейрона;
3. мієлінове волокно з нейрофібрилами;
4. безмієлінове волокно з мітохондрією.

На люмінальній поверхні ендотелію відзначається помірна кількість мікроворсинок, кількість рибосом зменшено, мітохондрії містять світлий матрикс і невелику кількість крист (рис. 3.15).

В нейронах даної експериментальної групи ядра ендотеліальних клітин збільшені, наповнені помірною кількістю гетерохроматину. Мембрани каріотеки по периметру ядра мають локуси розпушення, у структурі ядерця спостерігаються характерні компоненти ядерцевих організаторів. Навколо артеріол і венул спостерігаються незначні ділянки периваскулярного набряку та змішаної лімфоцитарно-гістіоцитарної інфільтрації.

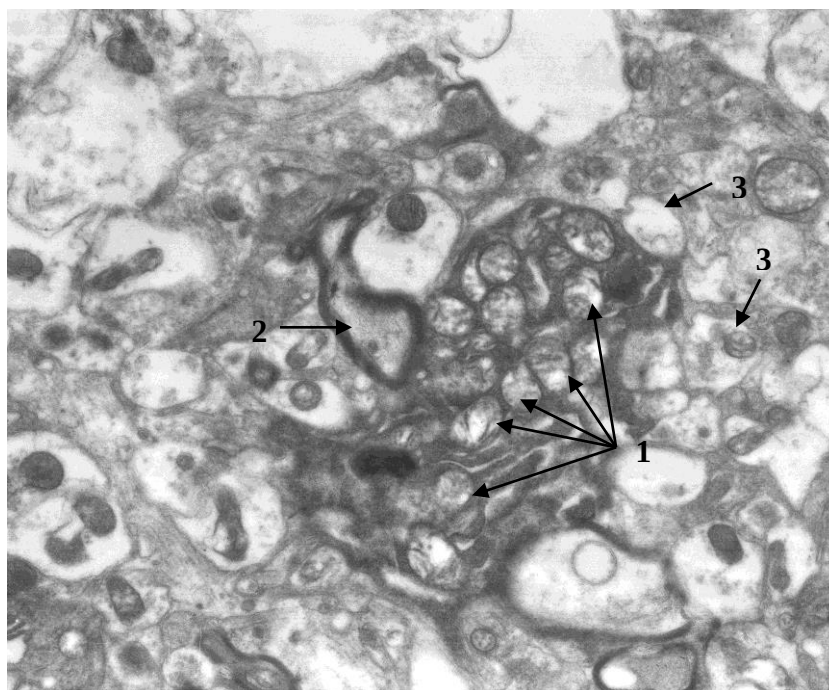


Рис. 3.15. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном. 3б.х 16000.

Позначення:

- 1. мітохондрії;
- 2. мієлінове волокно;
- 3. безмієлінові волокна.

Порушення ультраструктури нейронів гіпокампу головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном мають більш різноманітний характер порівняно з групою ізольованого експериментального алергічного енцефаломієліту, однак ступінь дифузійних порушень нейроцитів істотно знижена. Окрім одиничних нейроцитів з ознаками некробіотичних змін і великої кількості нейроцитів з ознаками відносної адаптації, зустрічаються поодинокі фігури апоптозу нейронів. В основному це початкові стадії апоптотичних процесів, які розвиваються за мітохондріальним типом. У таких клітинах спостерігається крупнодисперсне пошкодження нуклеоплазми з частково збереженою активністю ядра. Лізосом небагато, у перикарионі – помірна дезорганізація гранулярного ретикулуму з набуханням цистерн і утворенням

вакуолоподібних цистерн. Мітохондрії мають ділянки дефрагментації зовнішніх мембран, частково зруйновані кристи, нерівномірну електронну щільність матриксу. Зрідка зустрічаються мітохондрії із збереженою структурою крист.

Більшість нейроцитів з помірними порушеннями перикаріона за вакуолярним типом містять ядра з активною нуклеоплазмою або з ознаками помірно обмеженої функціональної активності. Нуклеолема на всьому протязі стабільна, без фрагментації. Явища хроматолізу, набряк та вакуолізація цистерн пластинчастого апарату та ендоплазматичного ретикулуму не виражені. Мітохондрії представлені різними за структурою органеллами, а саме: зустрічаються збільшені в розмірах мітохондрії з вакуолярним типом ушкодження, без ознак руйнування зовнішніх мембран, помірним кристолізисом, електронно-світлим матриксом. Гігантські мітохондрії нами в даній групі не виявлені. Частина мітохондрій – з відносно стабільними кристами, невеликих розмірів, з помірно щільним матриксом. Кількість мікромітохондрій істотно не відрізняється від групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту, проте всі вони містять стабільні зовнішні мембрани і кристи, гомогенний матрикс без електронно-щільних включень. Ступінь перинейронального набряку незначна (рис. 3.16).

Відростки і тіла олігодендроцитів і астроцитів зони гіпокампу головного мозку щурів даної групи переважно середньої електронної щільності, міжклітинні простори між ними заповнені основною речовиною інтерстицію низької електронної щільності. В розширених відростках астроцитів, як і в цитоплазмі їх тіл, виявляються скупчення пучків філаментів і мітохондрій. Між окремими немієлізованими відростками аксонів присутні різної форми синапси, але їх частота виявлення відносно невисока.

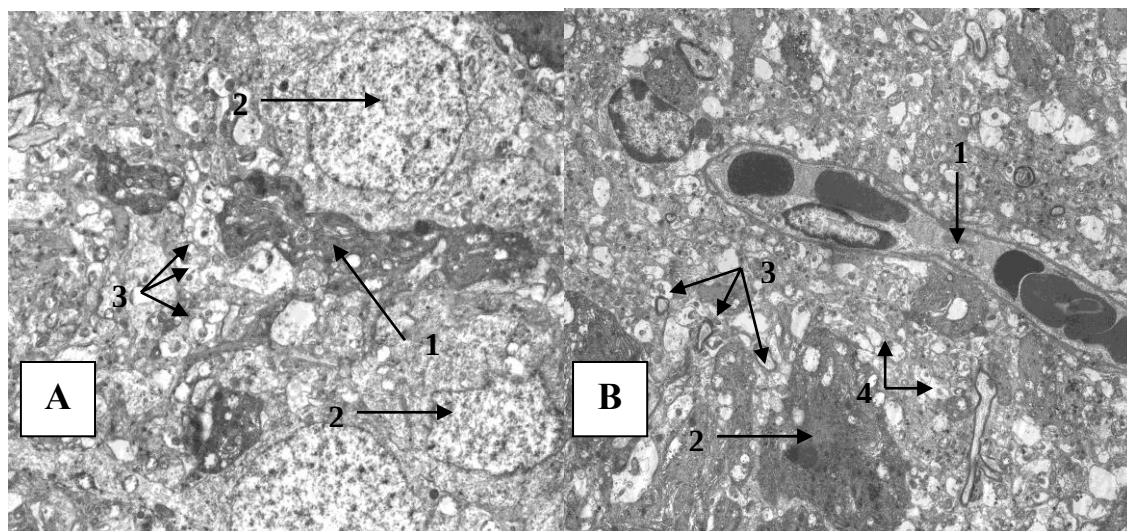


Рис. 3.16. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура контрольної групи (А) та групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном (В). 36.х 4000.

Позначення:

А: 1.нейрон;

2. протоплазматичний астроцит;

3.безмієлінове нервово волокно.

В: 1.просвіт гемокапіляру з форменими елементами крові;

2.цитоплазма нейрону;

3.мієлінові нервові волокна;

4.безмієлінові нервові волокна.

Деякі мієлізовані волокна мають розширений діаметр, в їх аксоплазмі виявляються розвинені мітохондрії і нейрофіламенти. Завитки мезаксона в деяких ділянках розпушені, але зберігають свою структурну цілісність і паралельну взаємну орієнтацію. Значна кількість мієлінових волокон має добре розвинену аксоплазму і чітко організовану оболонку. Завитки мезаксона на периферії окремих волокон мають неоднорідність упаковки зі зміщенням електронної густини до мієлінової оболонки (рис. 3.17).

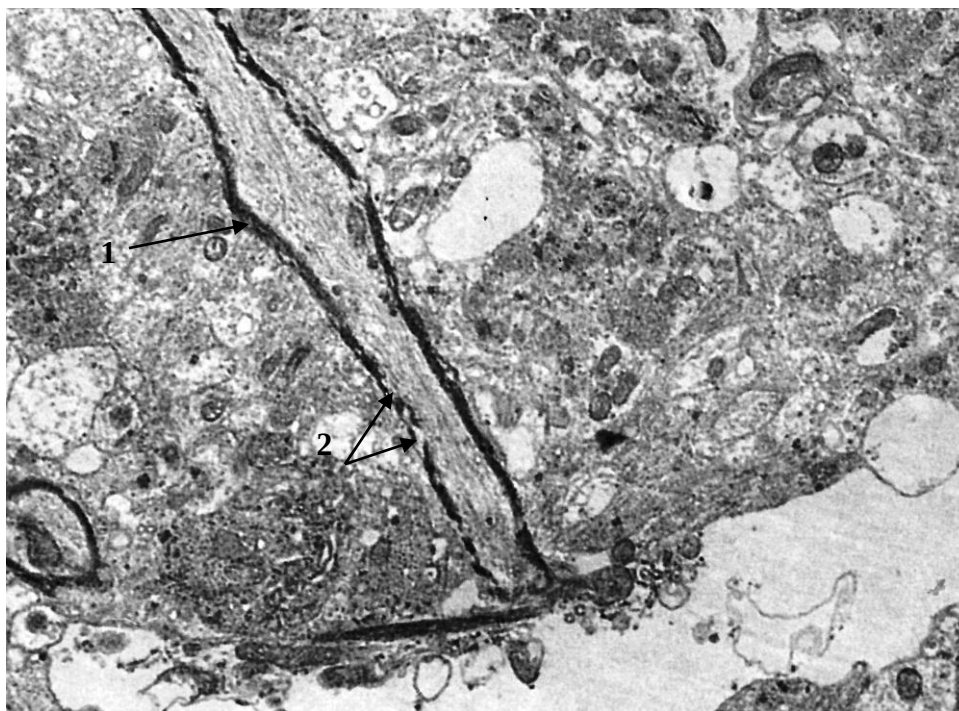


Рис. 3.17. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном. Зб.х 24000.

Позначення:

1. мієлінова оболонка нервового волокна;
2. ділянки демієлінізації.

Відновлення асиметрично розподіленої електронної густини в пошаровій структурі мієліну вказує на підвищення ізоляції аксона і створює умови для адекватного проведення імпульсу. Поодинокі мієлінові волокна з великим діаметром мають мієлінову оболонку з локальними розпушенням і разволокненням завитків мезаксону, іноді з наявністю невеликих коагулянтів. Безмієлінові нервові волокна — без патологічних ознак. Витончення і деформовані осьові циліндри зустрічаються значно рідше порівняно з групою експериментального алергічного енцефаломієліту.

Для гемокапілярів характерно присутність на люмінальній поверхні ендотеліальних клітин значної кількості мікрроворсинок, що простягаються на глибину просвіту мікросудини. Стінка гемокапілярів і артеріол — без істотних патоморфологічних ознак, проте в стінці венул виявляються

часткова деструкція періцитів і базальних мембран, а також наявність мілких локусів перивенулярного набряку, характерного для змін в групі експериментального алергічного енцефаломієліту. Зустрічаються венули, в просвіті яких відсутні еритроцити, однак містяться активовані і агреговані тромбоцити, що поряд з невеликим вмістом периваскулярних гематогенних клітин можна розглядати як механізм обмеження перивенулярної інфільтрації.

3.6.3. Оцінка ультраструктурних змін фронтальної кори та гіпокампу під впливом мелоксикаму за умов ЕАЕ на фоні глюкокортикоїдної терапії

В групі щурів експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі гормональної терапії та мелоксикаму ми не спостерігали на ультрамікроскопічному рівні порушень загальної цитоархітекτονіки кори фронтальної долі головного мозку як і в інших дослідних групах. Конденсація еухроматину, форма ядра та ядерця без виражених змін, а і цитоплазма нейронів мала помірну електронну щільність з елементами дрібнозернистості, нормально розвинутою ендоплазматичною сіткою. Кількість та будова рибосом без видимих патологічних змін. Ми визначали в групі експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксикамом зменшення спектру патологічних змін в мітохондріях, які мало відрізнялися від норми кількістю та структурою крист, хоча мітохондріальний матрикс як і в групі експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном мав дещо знижену електронну щільність (рис. 3.18).

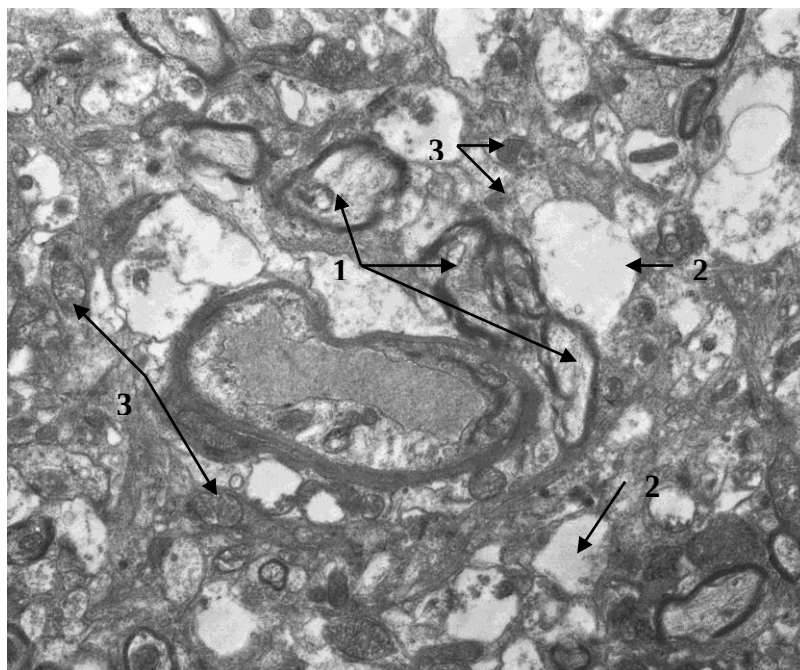


Рис. 3.18. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелаксікамом. 36.x 12000.

Позначення:

1. мієлінові волокна;
2. безмієлінові волокна;
3. мітохондрії.

Ультрамікроскопічні дослідження продемонстрували, що стан цитоплазматичної мембрани нейронів в більшості випадків мав чіткий контур, а перинейрональний набряк спостерігався в поодиноких випадках.

Дослідження ядер олігодендроцитів виявили незначне зменшення гетерохроматину на тлі однорідності еухроматину зі збереженням форми ядра. Цитоплазма олігодендроцитів містила такі органели як рибосоми, та мітохондрії без особливостей, а ступінь набряку цитоплазми був нижчим у порівнянні до групи з експериментальним алергічним енцефаломієлітом.

Дослідження кори фронтальної долі мозку щурів на ультраструктурному рівні продемонструвало розширення діаметру мієлінізованих волокон і нейрофіламентів поблизу нейронів. Завитки

мезаксона мієлінізованих волокон зберігають свою структурну цілісність і паралельну взаємну орієнтацію (рис. 3.19).

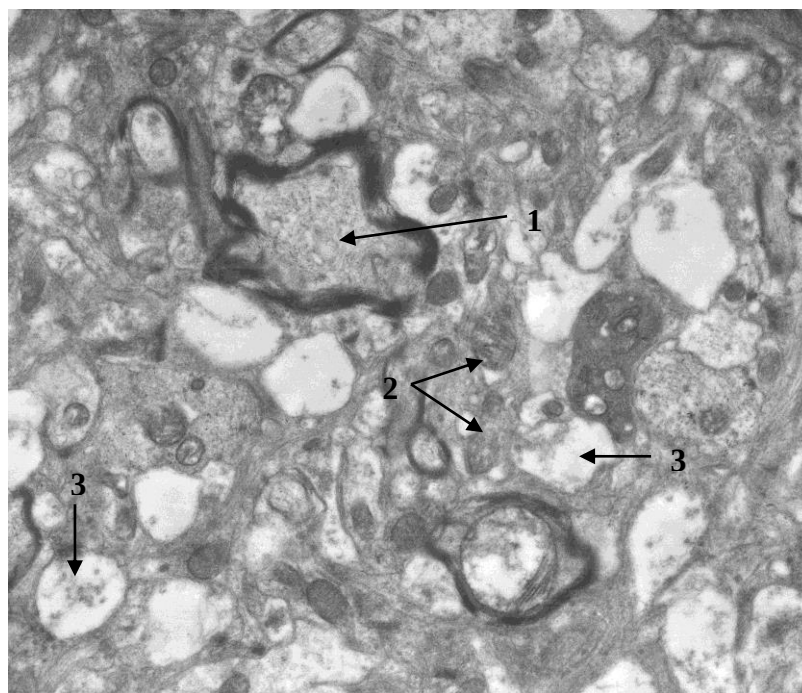


Рис. 3.19. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом. 36.x 16000.

Позначення:

1. мієлінове волокно з нейрофібрилами;
2. мітохондрія;
3. безмієлінові волокна.

Астроцити зустрічались в підвищеній кількості, без порушень внутрішньоклітинних органел. Нами спостерігались поодинокі скупчення астроцитів з мікрогліоцитами, функціональна активність мікрогліальних клітин визначалась на помірному рівні. Цитоплазма ендотеліоцитів мала типову будову без наявності порушень люмінальної і базальної зон плазматичної мембрани. На люмінальній поверхні ендотеліоцитів відзначається помірна кількість мікроворсинок, мітохондрії містять світлий матрикс і невелику кількість крист (рис. 3.20).

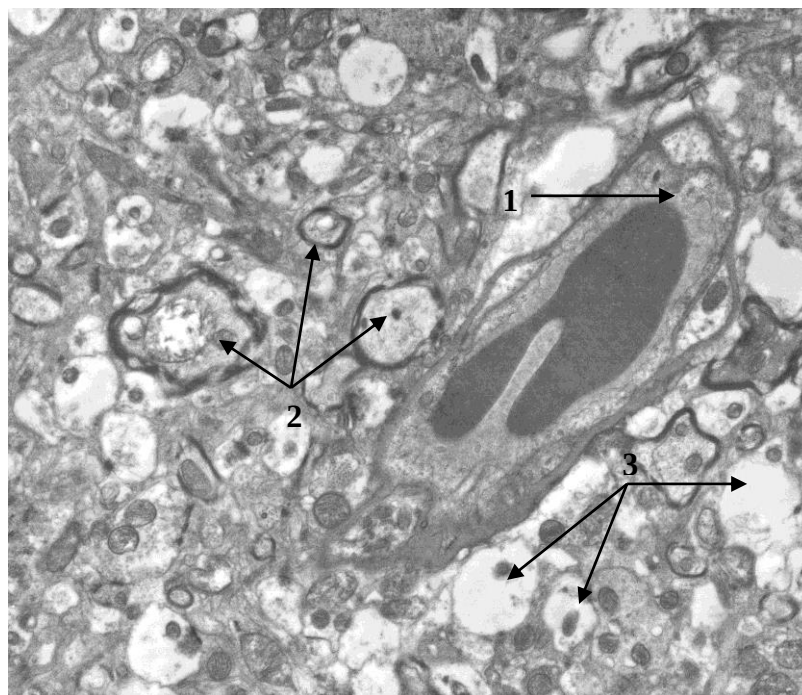


Рис. 3.20. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом. 36.x 10000.

Позначення:

1. просвіт гемокapіляру з клітинами крові;
2. мієлінові нервові волокна;
3. безмієлінові нервові волокна.

Порушення ультраструктури нейронів гіпокампі головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом мають менш виражений характер порівняно з групою ізольованого експериментального алергічного енцефаломієліту. На тлі великої кількості нейроцитів з ознаками відносної адаптації зустрічаються нейрони з ознаками дифузних порушень у вигляді незначних некробіотичних змін. Здебільшого це початкові стадії апоптотичних процесів, що розвиваються за мітохондріальним типом з частково збереженою активністю ядра. Ультрамікроскопічне дослідження виявило незначну кількість лізосом та помірну дезорганізацію гранулярного ретикулуму. Як і в попередніх дослідних групах, мітохондрії мають ділянки

дефрагментації зовнішніх мембран з частково зруйнованими кристами та нерівномірну електронну щільність матриксу (рис. 3.21).

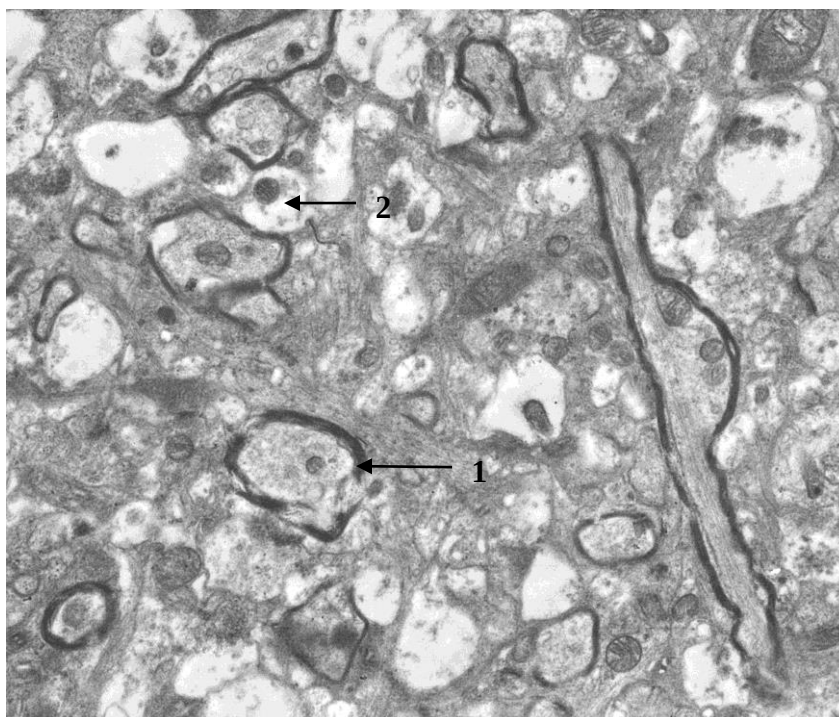


Рис. 3.21. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом. 36.x 12000.

Позначення:

1. мієлінове волокно з порушенням будови мієліну та зруйнованою мембраною мітохондрії;
2. безмієлінове волокно зі збереженою мітохондрією.

Більшість нейронів гіпокампу головного мозку щурів даної експериментальної групи мають помірні порушення перикаріона та містять ядра з активною нуклеоплазмою, або з ознаками помірно обмеженої функціональної активності. В даній експериментальній групі нуклеолема клітин на всьому протязі стабільна, без фрагментації, явища хроматолізу не виражені. Набряк ендоплазматичного ретикулуму незначний, відсутня вакуолізація цистерн пластинчастого апарату. Мітохондрії поліморфні, а саме: зустрічаються як збільшені в розмірах мітохондрії з вакуолярним типом ушкодження, так і мікромітохондрії без ознак руйнування зовнішніх мембран, з помірним кристолізисом, електронно-світлим матриксом.

Гігантські мітохондрії в даній групі досліджень не виявлені. Частина мітохондрій – з відносно стабільними кристами, з помірно щільним матриксом (рис. 3.22).

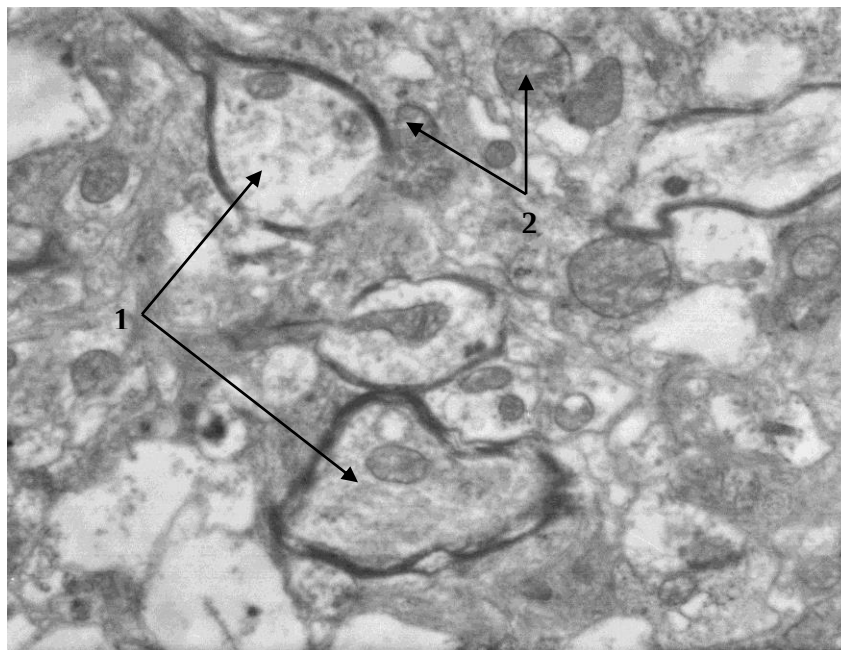


Рис. 3.22. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом. Зб.х 20000.

Позначення:

1. мієлінове волокно з частковим розшаруванням мієлінової оболонки;
2. мітохондрії.

Дослідження довели, що кількість мікромітохондрій при введенні мелоксікаму на тлі гормональної терапії експериментального алергічного енцефаломієліту зростає, вони містять стабільні зовнішні мембрани і кристи, гомогенний матрикс без електронно-щільних включень. Ступінь перинейронального набряку незначна (рис. 3.23).

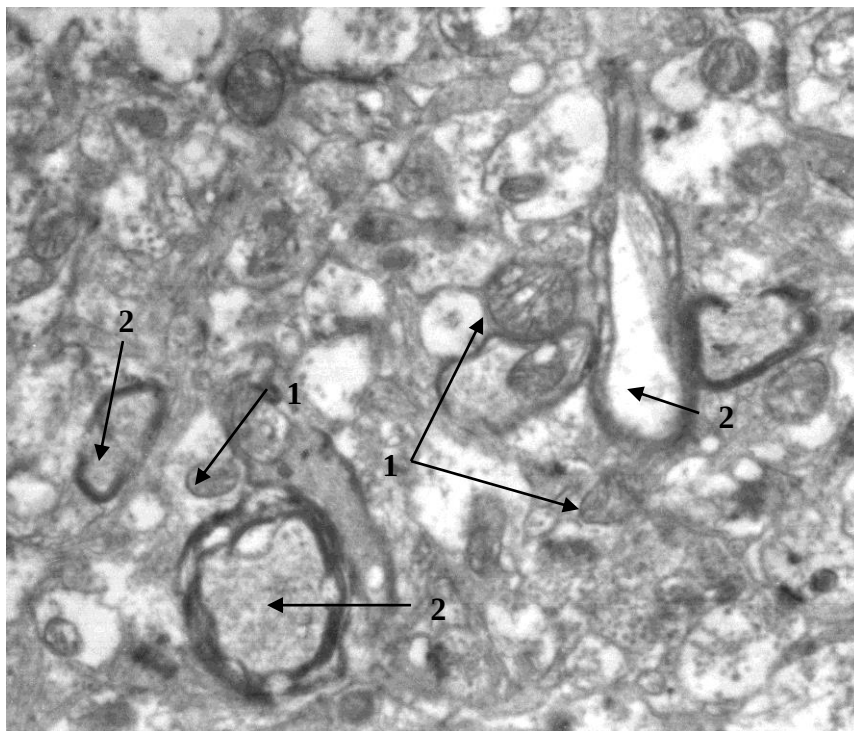


Рис. 3.23. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та мелоксікамом. 36.x 20000.

Позначення:

1. мітохондрії;
2. мієлінові нервові волокна.

Відростки і тіла олігодендроцитів і астроцитів гіпокампу головного мозку щурів в даній експериментальній групі переважно середньої електронної щільності. Ми спостерігали скупчення пучків філаментів і мітохондрій в розширених відростках астроцитів і в цитоплазмі їх тіл. Між окремими немієлізованими відростками аксонів частота виявлення різної форми синапсів відносно невисока.

Деякі мієлізовані волокна мають розширений діаметр, в їх аксоплазмі виявляються розвинені мітохондрії і нейрофіламенти. Завитки мезаксона в деяких ділянках розпушені, але зберігають свою структурну цілісність і паралельну взаємну орієнтацію з чітко організованою оболонкою.

Мієлінові волокна з великим діаметром містять локальні розпушення і разволокнення завитків мезаксону, безмієлінові нервові волокна – не мали патологічних ознак.

Стінка гемокапілярів і артеріол групи введення мелоксікаму на тлі гормонального лікування експериментального алергічного енцефаломієліту без істотних патоморфологічних ознак, проте в стінці окремих мікросудин (здебільшого венул) виявляється часткова деструкція періцитів і базальних мембран. Перивенулярний набряк, характерний для речовини гіпокампу в групі експериментального алергійного енцефаломієліту, не виражений.

Таким чином, за результатами проведеного дослідження виявлена компенсаторна дія мелоксікаму на тлі лікування метилпреднізолоном експериментального алергійного енцефаломієліту як на стан нейронів кори і гіпокампу головного мозку, так і на стан мікросудин головного мозку щурів в експериментальних умовах.

3.7. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз антиноцицептивної активності НПЗЛЗ (диклофенаку натрію, ібупрофену, лорноксикаму, мелоксікаму, кеторолаку та целекоксибу) і анальгетика-антипіретика парацетамолу, їх впливу на поведінкові реакції (рухово-дослідницька активність в тесті «відкрите поле» і м'язовий тонус) та оцінку рівня PGH-синтази в головному та спинному мозку за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу на фоні базової терапії метилпреднізолоном. Крім цього проведений біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксікаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії болювого синдрому та демієлінізуючої патології із вивченням ультраструктурних змін деяких утворень мозку на фоні введення неопіїдних анальгетиків за умов ЕАЕ.

Аналіз результатів, описаних у цьому розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Інокуляція енцефалітогенної суміші на 9 - 11 добу викликає розвиток ЕАЕ, який сприяє розвитку порушень орієнтовно-дослідницької активності, нейрональної сенситизації, а також зниженню м'язового тону у експериментальних тварин.

2. На фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу максимально виражену знеболюючу активність виявляють мелоксикам, лорноксикам та кеторолак.

3. За умов ЕАЕ болезаспокійливі засоби не спроможні повністю усувати дефіцит рухової активності та відновлювати ослаблені патологією орієнтовно-дослідницькі навички у щурів. Найбільш виражений вплив анальгетиків щодо часткової нормалізації поведінкових реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення ібупрофену, лорноксикаму та кеторолаку.

4. З урахуванням базової терапії метилпреднізолоном найбільш виражений протизапальний потенціал виявляв мелоксикам, максимально знижуючи активність PGH-синтази в головному та спинному мозку експериментальних тварин.

5. У досліджуваній 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.

6. Застосування електрономікроскопічного дослідження дозволило виявити ряд суттєвих морфологічних порушень в будові кори фронтальної

долі та гіпокампу головного мозку дослідних тварин в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту.

7. За результатами проведеного дослідження виявлена компенсаторна дія мелоксікаму 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.

РОЗДІЛ 4

ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗАСОБІВ ЗНЕБОЛЮЮЧОЇ АД'ЮВАНТНОЇ ТЕРАПІЇ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Практично постійним і найбільш частим проявом розсіяного склерозу є наявність хронічних больових синдромів, частота яких натеper, за даними різних авторів, досягає 50-80%. Патогенетичні механізми ноцицептивної передачі в залежності від типу та виду болю, його часових характеристик дещо відрізняються, що визначає тактику фармакологічних підходів терапії конкретного больового синдрому [329].

Підбір індивідуального фармакологічного лікування для кожного пацієнта залежить від багатьох факторів, що враховують джерело, причину та патофізіологічний механізм болю, а також наявність супутніх станів. Кардинальною помилкою у лікуванні болю є об'єднання всіх терапевтичних альтернатив прийомом тільки анальгетиків [11]. Відомо, що в процесі терапії хронічного больового синдрому для посилення дії знеболюючих препаратів, а також з метою корекції небажаних симптомів, які супроводжують основне захворювання, зокрема, розсіяний склероз, застосовуються ад'ювантні та симптоматичні засоби.

На сьогодні при невропатичному болю в якості ад'ювантних болезаспокійливих засобів призначають антиконвульсанти, механізм дії яких пов'язують з гальмуванням проведення больової імпульсації по периферичних нервах і гангліях задніх корінців, дією на патологічні процеси, що відбуваються в задніх рогах та чутливих ядрах черепних нервів, а також на ноцицептивні та антиноцицептивні механізми центральної нервової системи [272].

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз знеболюючого потенціалу антиконвульсантів (карбамазепіну, топірамату, натрію вольпроату, габапентину та прегабаліну) у інтактних тварин та за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

4.1. Дослідження змін антиноцицептивного потенціалу антиконвульсантів у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном

Дослідження проведенні на 70 білих нелінійних щурах масою 220-290 г, які утримувались у стандартних умовах віварію ДЗ «ДМА МОЗ України» [192]. Оцінку знеболюючого потенціалу антиконвульсантів проводили шляхом вивчення їх антиноцицептивної активності у інтактних тварин та реєстрації ноцицептивної відповіді (реакція вокалізації) за умов сформованого ЕАЕ при одноразовому введенні засобів на тлі 5-денної терапії метилпреднізолоном за методом електричного подразнення кореня хвоста щурів (докладний опис представлений в розділі 2).

В I серії експериментальних досліджень інтактних тварин методом випадкової вибірки розділили на 7 груп по 10 гризунів, яким одноразово інтрагастрально вводили досліджувані засоби дозами: I група – пасивний контроль (інтактні); II група – метилпреднізолон (М); III група – метилпреднізолон + карбамазепін (150 мг/кг); IV група – метилпреднізолон + топірамат (300 мг/кг); V група – метилпреднізолон + натрію вольпроат (155 мг/кг); VI група – метилпреднізолон + габапентин (100 мг/кг); VII група – метилпреднізолон + прегабалін 100 мг/кг.

Зазначено, що показники больового порогу у вихідному стані реєструвались в межах від $1,6 \pm 0,1$ В (гр. IV) до $1,8 \pm 0,1$ В (гр. II).

Показано, що на фоні введення досліджуваних засобів максимальний розвиток болезаспокійливої дії спостерігався на 90 хвилині. При цьому при

застосуванні габапентину та прегабаліну знеболюючий потенціал продовжував реєструватись достатньо високим (+166,1% ($p \leq 0,05$) та +199,4% ($p \leq 0,05$) відповідно) і на 120 хвилині у порівнянні з показниками вихідного стану (табл. 4.1. та рис. 4.1).

Таблиця 4.1

Вплив внутрішньошлункового введення антиконвульсантів на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста у інтактних тварин (n=10)

Досліджувані засоби	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості (ПБЧ), В ($M \pm m$)				
		BC	30 хв.	60 хв.	90 хв.	120 хв.
Контроль (фізіол. р-н)	0,1 мл / 100 г	1,76±0,08	1,92±0,08	1,65±0,10	1,50±0,07	1,35±0,10
Карбамазепін	150,0	1,81±0,08	2,67±0,19	3,25* [□] ±0,25	3,87 [□] ±0,37	3,20 [□] ±0,35
Топірамат	300,0	1,79±0,13	2,82* [□] ±0,13	3,68* [□] ±0,35	4,40* [□] ±0,27	3,25* [□] ±0,31
Натрію вальпроат	155,0	1,60±0,12	2,50* [□] ±0,14	3,50* [□] ±0,37	4,18* [□] ±0,60	2,76* [□] ±0,19
Габапентин	100,0	1,62±0,13	2,47* [□] ±0,20	3,18* [□] ±0,31	4,43* [□] ±0,45	4,31 [□] ±0,43
Прегабалін	100,0	1,73±0,06	2,63* [□] ±0,21	3,18* [□] ±0,23	5,18* [□] ±0,35	5,18* [□] ±0,56

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до ПБЧ у вихідному стані (BC);

□ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи інтактного контролю.

Отже, по здатності блокувати проходження електричного подразнення у інтактних тварин досліджувані антиконвульсанти можна розташувати у наступному порядку: прегабалін (+199,4%) > габапентин (173,4%) > натрію вальпроат (161,2%) > топірамат (+145,8%) > карбамазепін (+113,8%).

В II серії експериментальних досліджень шляхом введення енцефалітогенної суміші в основу хвоста щурів відтворювали ЕАЕ: пік змін у тварин формувався на 11 добу дослідження; протягом наступних 5 днів щури

отримували метилпреднізолон в дозі 3,4 мг/кг в якості засобу базової патогенетичної терапії.

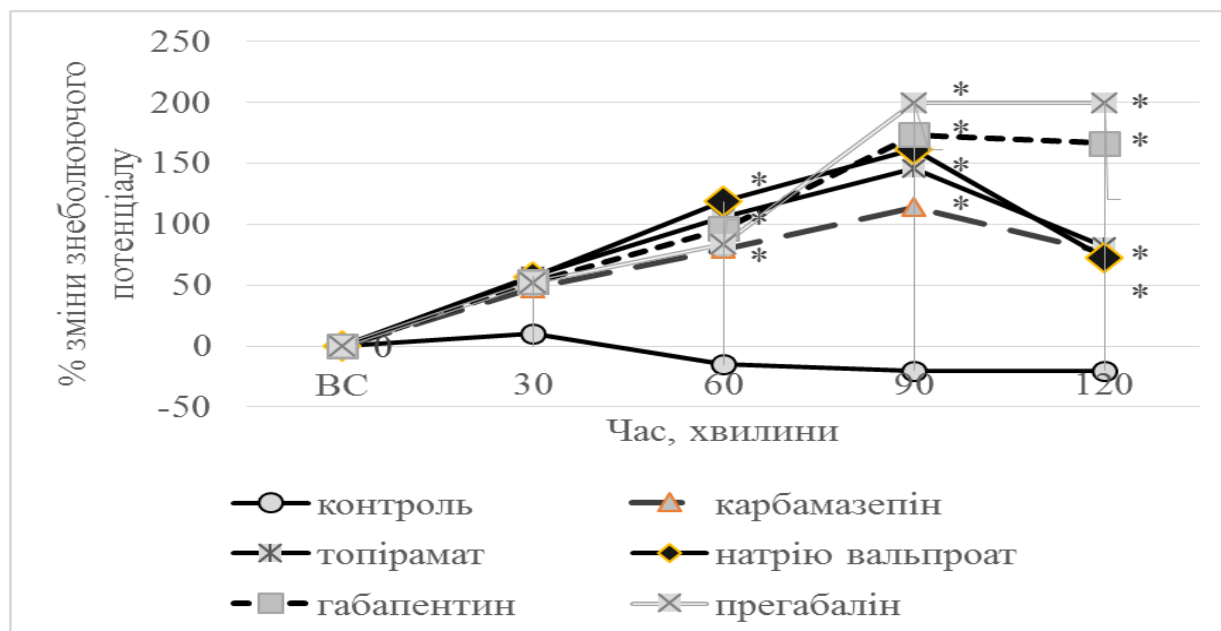


Рис. 4.1. Зміни знеболюючого потенціалу антиконвульсантів у інтактних тварин

Примітка. * - $p \leq 0,05$ по відношенню показників вихідного стану.

Тварин методом випадкової вибірки розділили на 7 дослідних груп ($n=10$), котрим одноразово внутрішньошлунково вводили протисудомні засоби за умов сформованого ЕАЕ: I група – активний контроль (ЕАЕ); II група – ЕАЕ + метилпреднізолон (М); III група – ЕАЕ + метилпреднізолон + карбамазепін (150 мг/кг), IV група – ЕАЕ + метилпреднізолон + топірамат (300 мг/кг), V група – ЕАЕ + метилпреднізолон + натрію вальпроат (155 мг/кг); VI група – ЕАЕ + метилпреднізолон + габапентин (100 мг/кг) та VII група - ЕАЕ + метилпреднізолон + прегабалін (100 мг/кг).

Встановлено, що у вихідному стані за умов сформованого ЕАЕ на тлі базової терапії метилпреднізолоном у щурів всіх груп реакція вокалізації реєструвалась на рівні від $1,3 \pm 0,312$ В (гр. IV) та $1,48 \pm 0,1$ В (гр. II).

Реєстрація антиноцицептивної відповіді після одноразового внутрішньошлункового введення протисудомних засобів на тлі базової

гормональної терапії проводилась на 90 хвилині (як часу прояву максимального анальгетичного ефекту досліджуваних засобів на I етапі чинного дослідження). Результати експерименту представлені в табл. 4.2 і на рис. 4.2.

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.

Таблиця 4.2

Вплив внутрішньошлункового введення антиконвульсантів на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста тварин за умов ЕАЕ на тлі терапії метилпреднізолоном (n=10)

Досліджувані комбінації	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості, В ($M \pm m$)	
		BC	90 хв
ЕАЕ, контроль (фізіол. р-н)	0,1 мл / 100 г	1,03±0,12	1,35±0,13
ЕАЕ + М	3,4	1,46±0,18	2,33* [□] ±0,23
ЕАЕ + М + Карбамазепін	3,4+150, 0	1,48±0,13	3,66* [□] ±0,46
ЕАЕ + М + Топірамат	3,4+300, 0	1,32±0,14	3,71* [□] ±0,33
ЕАЕ + М + Натрію вольпроат	3,4+155, 0	1,30±0,12	3,43* [□] ±0,45
ЕАЕ + М + Габапентін	3,4+100, 0	1,42±0,10	5,06* [□] ±0,32
ЕАЕ + М + Прегабалін	3,4+100, 0	1,37±0,13	5,56* [□] ±0,32

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до ПБЧ у вихідному стані (BC);

□ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи інтактного контролю.

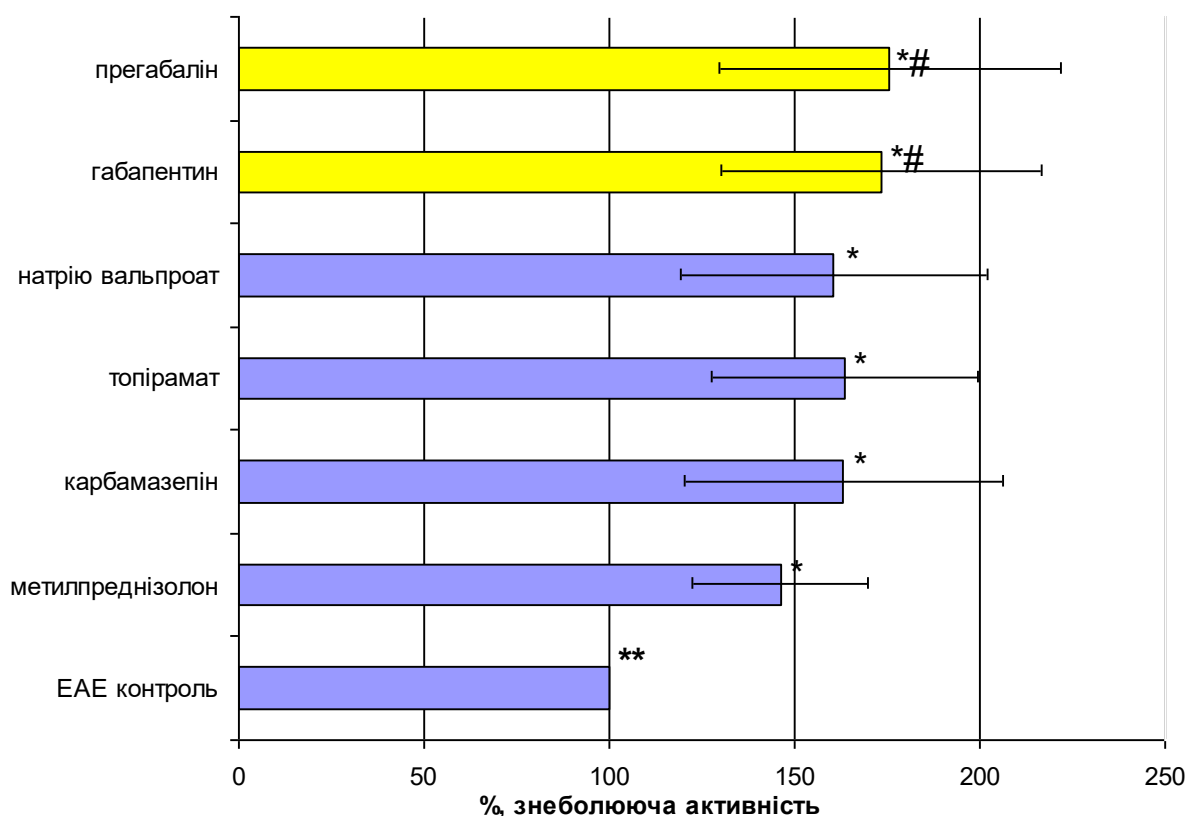


Рис. 4.2. Зміни антиноцицептивного потенціалу антиконвульсантів за умов ЕАЕ (90 хвилина) на тлі базової гормонотерапії

Примітки:

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи активного контролю (ЕАЕ);

** - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи пасивного контролю (інтактні);

- міжгрупові порівняння із використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, критерій Дункана.

Продemonстровано, що на фоні введення натрію вальпроату та топірамату знеболюючий потенціал засобів на 90 хвилині складав 163,8% ($p \leq 0,05$) та 181% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками вихідного стану.

Отже, для корекції больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном доцільно рекомендувати антиконвульсанти, насамперед, габапентин та прегабалін, які виявляють виражену знеболюючу активність за умов експериментального алергічного енцефаломієліту [129, 132, 139, 144, 154].

4.2. Вплив антиконвульсантів на дослідно-орієнтовні реакції щурів за умов експериментальної патології

Поліморфізм психічних порушень в діапазоні від невротичних розладів до психотичних станів і епілептоформного синдрому є типовим явищем у хворих на РС [38, 182]. Зазвичай такі порушення не виходять за межі екзогенного типу реагування, хоча частіше коло психопатологічних явищ у хворих даної категорії вичерпується розладами емоційної і інтелектуально-мнестичної сфер, яке потребує фармакологічної корекції [11]. Для терапії хронічного больового синдрому в якості ад'ювантних засобів використовують антиконвульсанти, які, до того ж, застосовуються для корекції розладів психічно-емоційного стану, що супроводжують основне захворювання, зокрема, розсіяний склероз.

В даному підрозділі представлені результати оцінки впливу антиконвульсантів (карбамазепін, топірамат, натрія вольпроат, габапентин та прегабалін) на поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.

Показано, що у вихідному стані всі тварини були досить активними: показники моторно-дослідницької та емоційної активності коливалися в межах фізіологічної норми для гризунів відповідної вікової групи. При цьому на 12 добу моделювання ЕАЕ у 100% тварин усіх груп зміни поведінкових реакцій в тесті «відкрите поле» мали однакову спрямованість (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на фоні сумісного введення антиконвульсантів з метилпреднізолоном (n=10)

Експериментальна група	Критерії оцінки тесту «відкрите поле»	Показники ($M \pm m$)		
		Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
1	2	3	4	5
ЕАЕ	квадрати	25,17±1,75	4,50±0,71	12,33±1,52
	нірки	8,33±1,08	2,50±0,22	2,50±0,67
	стійки	7,00±0,73	1,00±0,36	1,66*±0,49
	грумінг	1,50±0,22	0,66±0,21	0,83±0,16
	болюси	0,83±0,30	0,50±0,22	1,16±0,16

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ЕАЕ + Метилпреднізолон (М)	<i>квадрати</i>	28,83±3,0	11,33*±1,33	25,16±2,92
	<i>нірки</i>	9,16±0,74	2,33*±0,49	5,00*±1,03
	<i>стійки</i>	9,33±1,62	1,83*±0,16	8,16±1,27
	<i>грумінг</i>	2,66±0,61	0,50*±0,22	1,33±0,49
	<i>болюси</i>	1,66±0,33	1,33±0,64	1,50±0,42
ЕАЕ +М+ Карбамазепін	<i>квадрати</i>	29,16±2,55	8,66*±1,49	15,33*±1,8
	<i>нірки</i>	5,00±0,57	2,16*±0,30	3,50±0,61
	<i>стійки</i>	11,00±1,69	2,16*±0,65	4,16*±0,65
	<i>грумінг</i>	1,16±0,47	1,66±0,33	1,16±0,16
	<i>болюси</i>	1,33±0,49	2,00±0,36	1,00±0,25
ЕАЕ +М+ Топірамат	<i>квадрати</i>	34,83±4,65	7,66*±0,84	15,83*±2,53
	<i>нірки</i>	8,66±1,25	2,33*±0,49	3,83*±0,30
	<i>стійки</i>	10,83±1,24	2,50*±0,61	3,33*±0,98
	<i>грумінг</i>	1,33±0,49	1,00±0,36	1,16±0,30
	<i>болюси</i>	1,50±0,42	1,16±0,16	1,50±0,42
ЕАЕ +М+ Натрію вольпроат	<i>квадрати</i>	26,16±2,90	9,50*±1,25	11,50*±1,54
	<i>нірки</i>	7,83±1,07	3,33*±0,61	3,50*±0,67
	<i>стійки</i>	7,83±1,07	1,33*±0,61	2,83*±0,30
	<i>грумінг</i>	2,00±0,36	1,00±0,36	1,50±0,42
	<i>болюси</i>	1,50±0,56	1,33±0,42	1,50±0,50
ЕАЕ +М Габапентин	<i>квадрати</i>	36,33±3,68	9,66*±2,23	18,33*±2,02
	<i>нірки</i>	5,00±1,15	2,50*±0,42	2,83±0,30
	<i>стійки</i>	8,83±1,13	1,33*±0,61	4,66*±0,66
	<i>грумінг</i>	1,83±0,16	1,33±0,33	1,16±0,30
	<i>болюси</i>	2,00±0,36	1,50±0,56	1,33±0,21
ЕАЕ +М Прегабалін	<i>квадрати</i>	30,50±3,00	11,50*±1,45	20,83*±1,16
	<i>нірки</i>	6,83±1,04	1,83*±0,40	5,50±0,56
	<i>стійки</i>	8,66±1,58	0,33*±0,21	2,33*±0,55
	<i>грумінг</i>	2,33±0,42	0,66*±0,33	1,33±0,49
	<i>болюси</i>	2,16±0,30	0,83*±0,30	1,16±0,30

Примітка. * $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану.

Встановлено, що кількість перетнутих квадратів за даних умов експерименту коливалась в межах від 4,50±0,71 (група контролю) до 11,50±1,45 (група М+прегабалін), що відповідало зниженню рухової активності в середньому у 3,5 рази у порівнянні з показниками вихідного стану. Крім того, знизились показники дослідницької активності: число

заглядань у «нірки» та кількість вертикальних підйомів було в середньому у 4,5 рази ($p \leq 0,05$) меншим у порівнянні з відповідними показниками вихідного стану.

Як свідчать отримані результати, за умов введення метилпреднізолону спостерігалась позитивна динаміка відновлення рухової активності: якщо кількість перетнутих квадратів на 12 день моделювання ЕАЕ складала $11,33 \pm 1,33$, то вже після 5-денного введення кортикостероїду збільшилась у 2,2 рази ($p \leq 0,05$) (рис. 4.3).

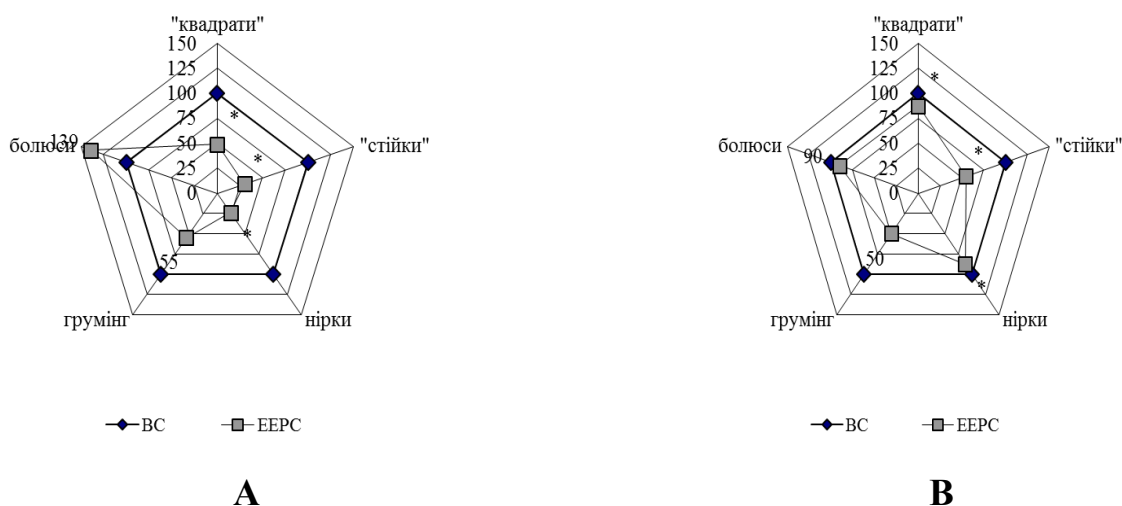


Рис. 4.3. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група контролю;

Б – група метилпреднізолону.

Аналізом показників дослідницької активності встановлено, що на 12 добу моделювання ЕАЕ кількість заглядань у «нірки» та стійок зменшилась на 74,57% ($p \leq 0,05$) та 80,40% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками вихідного стану. Проте на фоні 5-денного введення метилпреднізолону показник частоти вертикальних підйомів майже повернувся до показника

початку експерименту, хоча кількість заглядань у «нірки» ще залишалась зниженою у 1,8 рази ($p \leq 0,05$) (рис. 4.3).

Показано, що на фоні призначення метилпреднізолону сумісно з антиконвульсантами спостерігалось посилення рухової активності: кількість перетнутих квадратів реєструвалась в межах від $11,50 \pm 1,54$ (група V) до $25,16 \pm 2,92$ (група II), що у порівнянні з показниками групи контролю відповідало збільшенню моторної активності у 2 рази.

Однонаправлена тенденція змін спостерігалась щодо показників орієнтовно-дослідницької активності тварин. Так, кількість вертикальних підйомів у вихідному стані коливалась від $7,83 \pm 1,07$ (група V) до $11,0 \pm 1,69$ (група III). Після формування експериментальної моделі та наступних 5 днів призначення дослідних комбінацій кількість стійок залишалось зниженою у 1,97 раз для групи М+габапентин та у 3,35 ($p \leq 0,05$) рази для групи М+топірамат (рис. 4.4.).

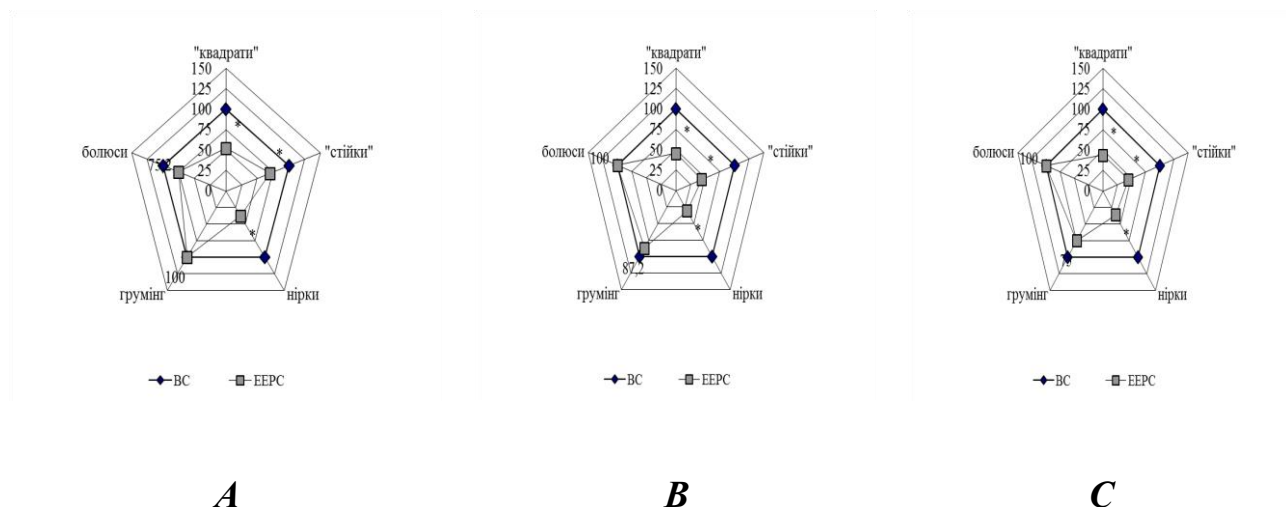


Рис. 4.4. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

A – М + карбамазепін;

B – М + топірамат;

C – М + натрію вольпроат.

При цьому число заглядань у «нірки» наприкінці досліду було статистично значимо меншим у порівнянні з показниками вихідного стану

мінімум у 1,2 рази (група М+прегабалін) та максимум - у 2,26 рази (група М+топірамат).

Показано, що на фоні призначення композицій М+габапентин та М+прегабалін спостерігалась більш виражені зміни рухової активності: кількість перетнутих горизонталей збільшилась на 80,86% ($p \leq 0,05$) та 81,73% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з 12 днем моделювання експериментальної патології. Максимальне відновлення дослідницької активності (заглядання у «нірки») зареєстроване на фоні отримання М+прегабалін: приріст показника становив 300% ($p \leq 0,05$) у порівнянні з показниками 12 доби експерименту (рис. 4.5).

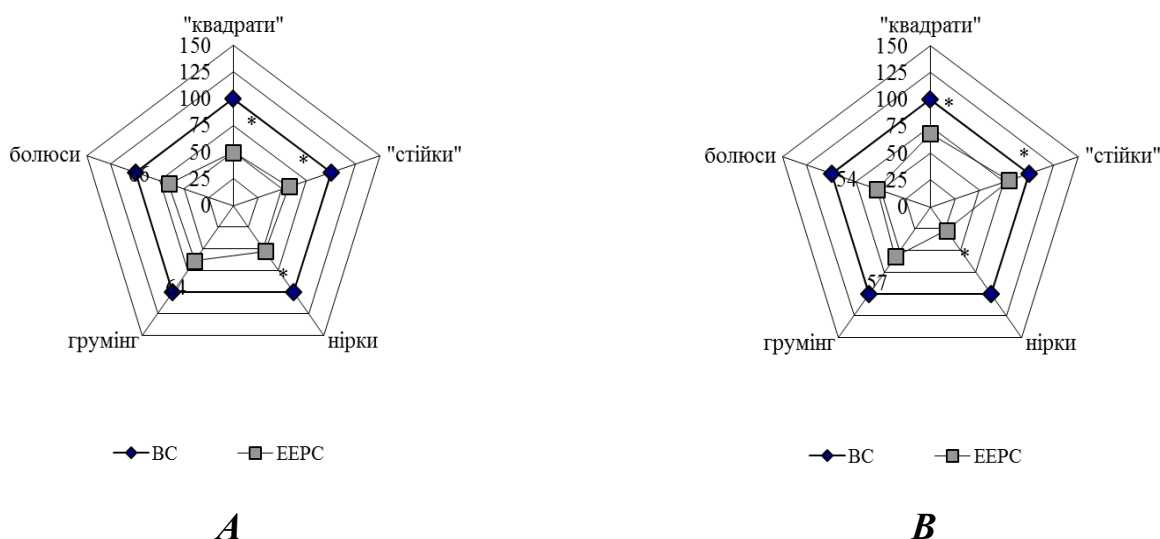


Рис. 4.5. Зміни поведінкових реакцій у щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група М + габапентин;

В – група М + прегабалін.

Отже, за умов ЕАЕ антиконвульсанти не здатні повністю усувати дефіцит рухової активності, але нормалізують дослідницьку діяльність у щурів в тесті «відкрите поле». При цьому за даних умов експерименту практично не змінюються показники емоційної активності. Найбільш виражений вплив антиконвульсантів щодо нормалізації поведінкових

реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення габапентину та прегабаліну [126, 130, 150].

4.3. Вивчення змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з протисудомними засобами за умов ЕАЕ

В даному підрозділі представлені результати оцінки впливу сумісного введення гормонального засобу з антиконвульсантами на стан м'язової сили за умов експериментального алергічного енцефаломієліту (табл. 4.4. та рис. 4.6).

Таблиця 4.4

Зміни м'язової сили щурів за умов моделювання ЕАЕ під впливом метилпреднізолону та його комбінацій з протисудомними засобами (n=10)

Дослідні засоби	М'язова сила ($M \pm m$)		
	Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
Контроль, ЕАЕ	12,0 $\pm$ 2,2	4,5* $\pm$ 1,4	0,6* $\pm$ 0,7
ЕАЕ + Метилпреднізолон (М)	9,25 $\pm$ 1,6	4,0* $\pm$ 1,0	2,7* $\pm$ 0,6
ЕАЕ + М + Карбамазепін	14,0 $\pm$ 1,3	4,7* $\pm$ 1,3	2,9* $\pm$ 1,4
ЕАЕ + М + Топірамат	12,1 $\pm$ 2,4	3,1* $\pm$ 1,6	1,7* $\pm$ 1,1
ЕАЕ + М + Натрію вольпроат	11,4 $\pm$ 2,0	3,4* $\pm$ 0,9	3,2* $\pm$ 1,0
ЕАЕ + М + Габапентин	12,6 $\pm$ 2,9	2,5* $\pm$ 1,0	7,25 $\pm$ 1,5
ЕАЕ + М + Прегабалін	12,1 $\pm$ 1,9	2,4* $\pm$ 1,0	7,12 $\pm$ 1,0

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників у вихідному стані (BC);

□ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи контролю.

Показано, що у вихідному стані мінімальний час, протягом якого щури висіли на пруті, був зареєстрований в групі М ($9,25 \pm 1,6$ сек), а максимальний – в групі М+карбамазепін ($14,0 \pm 1,2$ сек). При цьому після 12-денного відтворення ЕАЕ було зафіксовано зменшення м'язової сили у 2,3 ($p \leq 0,05$) рази для групи ІІ (мінімальний показник) та у 5,1 ($p \leq 0,05$) рази для групи VII (максимальний показник).

Встановлено, що на фоні 5-денного введення М та антиконвульсанта спостерігалось посилення м'язової сили на 190% ($p \leq 0,05$) та на 200% ($p \leq 0,05$) для груп, що отримували габапентин та прегабалін відповідно у порівнянні з показниками 12-денного формування ЕАЕ (рис. 4.6).

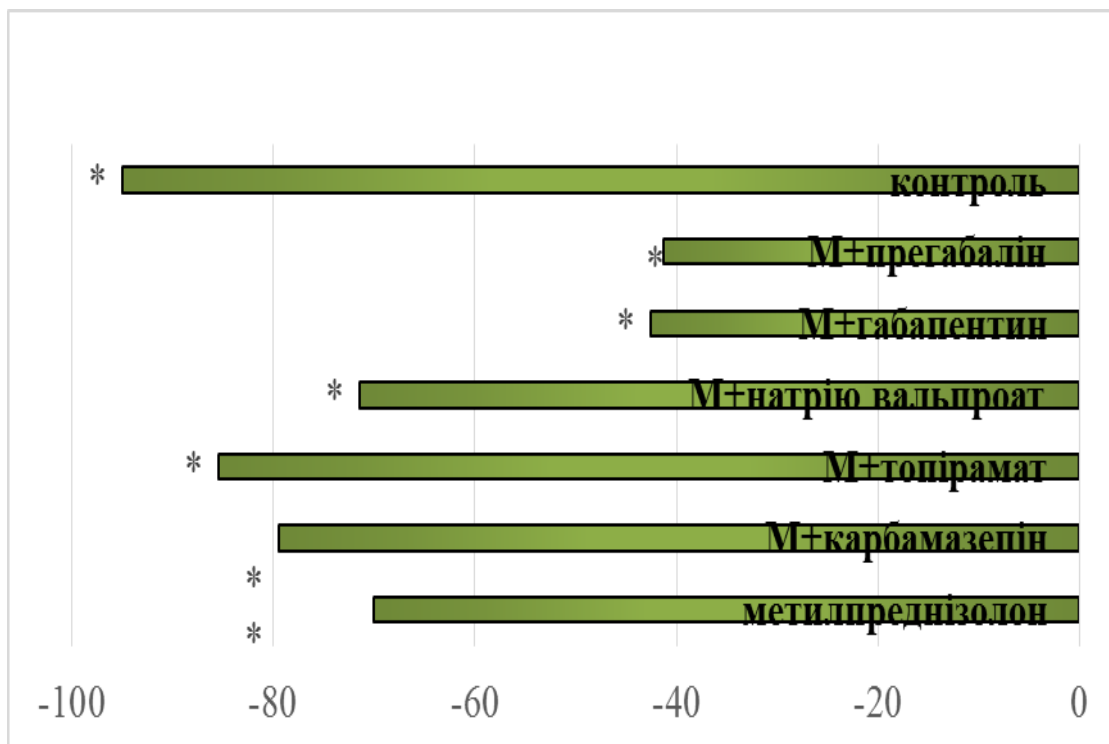


Рис 4.6. Зміни м'язової сили на фоні введення М та антиконвульсантів за умов ЕАЕ.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану.

Отже, комбіноване введення М з антиконвульсантами за умов модельованої патології не здатне повністю відновити м'язову силу, порушений індукцією ЕАЕ. При цьому застосування габапентину та

прегабаліну статистично значимо збільшує м'язову силу майже у 3 рази у порівнянні з показниками групи метилпреднізолону.

4.4. Оцінка нейрохімічних змін в утвореннях мозку на фоні введення досліджуваних комбінацій за умов ЕАЕ

Відомо, що антиоксидантна система протидіє шкідливому впливу вільних радикалів, які утворюються в процесі демієлінізації в центральній нервовій системі. Дія ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ), зокрема, супероксиддисмутази (СОД), спрямована на зниження концентрації продуктів ліпопероксидації, необхідного для забезпечення нормального протікання біохімічних процесів у клітині.

Активація процесів перекисного окислення ліпідів призводить до нагромадження токсичних продуктів (зокрема, малонового діальдегіду - МДА), які шкідливо впливають на клітинні мембрани.

В даному підрозділі представлені результати вивчення змін показників вільнорадикального окислення та АОЗ за умов ЕАЕ на фоні введення дослідних комбінацій метилпреднізолону та антиконвульсантів в структурах головного (кора та стовбур) та спинного мозку (грудний та поперековий відділи) згідно методикам, викладеним в розділі 2.

Результати аналізу нейрохімічних змін в утвореннях мозку (активності СОД і рівня МДА) на фоні сумісного введення метилпреднізолону та антиконвульсантів представлені в табл. 4.5.

Показано, що за даних умов експерименту у групі контролю спостерігалася досить низька активність СОД в утвореннях мозку (кора, стовбур, спинний мозок). При цьому дещо вищі показники функціонування системи АОЗ у порівнянні з показниками групи контролю реєструвалися після 5-денного введення метилпреднізолону, що проявлялося підвищенням активності СОД у корі та стволі на 146% ($p > 0,05$) та 78,9% ($p > 0,05$) відповідно.

Встановлено, що найвищі показники активності системи антиоксидантного захисту спостерігалися для кори великих півкуль – у гр. VII ($0,712 \pm 0,07$ ум. од./мг білка), для стовбура мозку – в гр. III та гр. VII ($0,816 \pm 0,18$ ум. од./мг білка і $0,654 \pm 0,09$ ум. од./мг білка відповідно), для спинного мозку – у гр. III ($0,615 \pm 0,14$ ум. од./мг білка).

Аналізом результатів вивчення концентрації МДА показано, що найбільш високі показники рівня пероксидації у корі головного та спинного мозку реєструвалися в групі контролю. При цьому мінімальна концентрація МДА спостерігалася в групі VII – у 3,15 рази нижчою в корі, у 1,95 рази в стовбурі та у 5,5 рази в спинному мозку у порівнянні з показниками контролю. При цьому в групі VI рівень МДА у корі та спинному мозку був меншим на 67,4% ($p < 0,05$) та на 56,6% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольною групою (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Оцінка нейрохімічних змін в утвореннях головного (кора, стовбур) та спинного мозку під впливом метилпреднізолону та його комбінацій з протисудомними засобами за умов ЕАЕ

Групи	Утворення мозку	Активність СОД, ум. од. / мг білка	Рівень МДА, нмоль/мг
Інтактні	Кора	$0,443 \pm 0,07$	$0,261 \pm 0,02$
	Стовбур	$0,435 \pm 0,05$	$0,406 \pm 0,04$
	Спинний мозок	$0,627 \pm 0,06$	$0,364 \pm 0,04$
І група	Кора	$0,101^{\square} \pm 0,08$	$1,585^{\square} \pm 0,11$
	Стовбур	$0,282^{\square} \pm 0,08$	$1,181^{\square} \pm 0,16$
	Спинний мозок	$0,180^{\square} \pm 0,05$	$1,890^{\square} \pm 0,22$

Продовження таблиці 4.5

II група	Кора	0,249*±0,07	1,352±0,15
	Стовбур	0,320±0,15	1,171±0,13
	Спинний мозок	0,322*±0,15	1,470±0,11
III група	Кора	0,535*±0,13	0,824*±0,05
	Стовбур	0,816*±0,18	0,489*±0,05
	Спинний мозок	0,615*±0,14	0,641*±0,14
IV група	Кора	0,296*±0,09	1,031±0,07
	Стовбур	0,396*±0,10	0,583*±0,07
	Спинний мозок	0,277±0,08	0,933*±0,10
V група	Кора	0,360*±0,02	0,632*±0,01
	Стовбур	0,441*±0,01	0,518*±0,02
	Спинний мозок	0,289±0,01	0,764*±0,02
VI група	Кора	0,551*±0,11	0,517*±0,05
	Стовбур	0,229±0,08	0,803*±0,05
	Спинний мозок	0,411*±0,08	0,820*±0,13
VII група	Кора	0,712*±0,07	0,503*±0,08
	Стовбур	0,654*±0,09	0,603*±0,15
	Спинний мозок	0,427*±0,10	0,341*±0,03

Примітки:

□ - $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю (інтактні);

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ).

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

4.5. Дослідження впливу антиконвульсантів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі базової терапії метилпреднізолоном

В рамках соматогенних больових синдромів у хворих на розсіяний склероз найчастіше зустрічаються болі в спині (35-80% випадків) та суглобах (до 7,5 % спостережень), причинами яких вважають розлади моторики, порушення м'язової сили, остеопороз і тривалу іммобілізацію [298]. Проте найчисленнішу групу при РС складають болі невропатичного характеру, які можуть проявлятися печінням, дизестезіями, поколюванням або відчуттям болю у відповідь на не больовий стимул [4, 296].

Найчастіше при розсіяному склерозі зустрічаються дизестезії, які спостерігаються у пацієнтів з переважним залученням малих С-волокон, що викликають розлади поверхневої больової і температурної чутливості та вегетативну дисфункцію [20]. Прояви невропатичного больового синдрому при РС суттєво знижують якість життя пацієнтів, призводять до інвалідизації, а також є причиною соціальної дезадаптації [4, 110, 318].

Для терапії невропатичного больового синдрому при розсіяному склерозі застосовують амітриптилін, ламотриджин, карбамазепін, габапентин, топірамат, хоча широкомасштабних доказових досліджень ефективності цих препаратів не проводили [67, 110].

Враховуючи зазначене, ми вважали доцільним проведення порівняльного фармакологічного аналізу впливу антиконвульсантів (карбамазепін, топірамат, натрія вольпроат, габапентин та прегабалін) на прояви невропатичного больового синдрому за умов експериментального алергічного енцефаломієліту (EAE).

Оцінку ефективності впливу досліджуваних препаратів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефаломієлітом, проводили на білих нелінійних щурах, які були розподілені на 7 груп: I – інтактні тварини (пасивний контроль), n=12; II

– щури з ЕАЕ (активний контроль), $n=12$; III – ЕАЕ + метилпреднізолон (М) + карбамазепін (150 мг/кг), $n=12$; IV – ЕАЕ + М + топірамат (300 мг/кг), $n=12$; V – ЕАЕ + М + натрію вальпроат (155 мг/кг), $n=12$; VI – ЕАЕ + М + габапентин (100 мг/кг), $n=6$; VII – ЕАЕ + М + прегабалін (100 мг/кг), $n=12$.

Реєстрацію порогів тактильної та больової чутливості проводили в кожній групі експериментальних тварин з ЕАЕ. Тактильну алодинію вивчали в модифікації філаментного тесту von Frey шляхом реєстрацією тиску, при якому тварини відсмикували ліву задню лапу, уникаючи впливу наростаючих по силі стимулів. Оцінку впливу препаратів на прояви хімічної гіпералгезії проводили з використанням формалінового тесту, термічної гіпералгезії - в тесті «гаряча пластина» (опис методик детально представлений в розділі 2).

Для визначення впливу препаратів на нейрональну сенситизацію, алодинію і гіпералгезію тваринам протягом тижня вводили метилпреднізолон згідно клінічному алгоритму застосування препарату. Крім того, з метою визначення фармакологічної активності антиконвульсантів їх застосовували додатково внутрішньошлунково один раз на добу з другого по 16-й день після індукції ЕАЕ (латентна фаза + клінічна фаза до закінчення піку захворювання).

Показано, що підшкірна інокуляція енцефалітогенної суміші викликала розвиток нейрональної сенситизації, алодинії і гіпералгезії. Так, у тварин експериментальних груп після індукції ЕАЕ реєструвалося статистично значиме зниження порогу тактильної чутливості в 2,3 рази ($p < 0,001$) по відношенню до інтактного контролю. При цьому ін'єкція 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи щурів призводило до статистично значимого збільшення загальної кількості здригувань в 9,5 рази ($p < 0,001$) по відношенню до групи інтактних тварин. До того ж, у тесті «гаряча пластина» у щурів з ЕАЕ-індукованою невропатією латентний період реакції уникнення статистично значимо знижувався в 1,7 рази ($p < 0,05$) по відношенню до групи інтактного контролю (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Характеристика проявів невропатичного больового синдрому за умов експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів

<i>Групи тварин</i>	<i>Тактильна алодинія, поріг відсмикування, г</i>	<i>Формаліновий тест, загальна кількість здригувань</i>	<i>Тест «hot plate», латентний період уникнення, сек</i>
Інтактний контроль (n = 12)	12,9 ± 1,40	7,3 ± 0,56	10,5 ± 0,99
ЕАЕ (n = 12)	5,7* ± 0,66	69,6* ± 6,53	5,9** ± 0,77

Примітки:

* - $p < 0,001$ по відношенню до показників інтактного контролю;

** - $p < 0,05$ по відношенню до показників інтактного контролю.

Результати оцінки проявів алодинії та гіпералгезії після курсового застосування антиконвульсантів за умов ЕАЕ-індукованої невропатії представлені в табл. 4.7.

Встановлено, що у тварин III – VII експериментальних груп після курсового введення протисудомних засобів при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки реєструвалося підвищення порогу тактильної чутливості по відношенню до показників активного контролю. При цьому 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%, $p > 0,05$) (табл. 4.7).

Відомо, що розвиток стимулзалежного болю, який виникає у відповідь на подразнення сенсibilізованих в результаті пошкодження периферичних ноцицепторів, опосередковується механізмами, обумовленими порушенням процесів гальмування на рівні заднього рогу [296]. Внаслідок збільшення збудливості чутливих нейронів задніх рогів спинного мозку, пов'язаних із зоною іннервації пошкодженого нерва, відбувається сенсibilізація прилеглих інтактних нейронів з розширенням рецептивної

зони [296]. Сенсibiliзація нейронів задніх рогів приводить до зниження больового порогу і розвитку аллодинії, тобто появи больових відчуттів на подразнення, яке в нормі ними не супроводжується [296].

Таблиця 4.7

Зміни тактильної чутливості, хімічної та термічної гіпералгезії у щурів після курсового комбінованого введення метилпреднізолону з антиконвульсантами

<i>Групи тварин</i>	<i>Тактильна аллодинія, поріг відсмикування, г</i>	<i>Формаліновий тест, загальна кількість здригувань</i>	<i>Тест «hot plate», латентний період уникнення, сек</i>
Інтактний контроль (n = 12)	12,9 ± 1,40	7,3 ± 0,56	10,5 ± 0,99
Активний контроль (n = 12)	5,7* ± 0,66	69,6* ± 6,53	5,9** ± 0,77
Карбамазепін, 150 мг/кг (n = 12)	7,0 ± 0,67	56,8 ± 6,99	8,7 [□] ± 0,56
Топірамат, 300 мг/кг (n = 12)	7,8 ± 1,66	49,3 ± 4,57	8,8 [□] ± 0,60
Натрію вальпроат, 155 мг/кг (n = 12)	8,1 ± 1,53	53,0 ± 4,49	9,0 [□] ± 0,82
Габапентин, 100 мг/кг (n = 12)	10,2 [□] ± 1,63	37,8 [□] ± 4,64	9,3 [□] ± 0,80
Прегабалін, 100 мг/кг (n = 12)	9,7 [□] ± 1,80	40,0 [□] ± 4,63	9,0 [□] ± 0,58

Примітки:

- * - $p < 0,001$ по відношенню до показників інтактного контролю;
- ** - $p < 0,05$ по відношенню до показників інтактного контролю;
- - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.

Показано, що після курсового введення антиконвульсантів загальна кількість здригувань, що викликаються ін'єкцією 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи ЕАЕ-асоційованих щурів, було меншим, ніж у групі контролю. Так, кількість відповідей ранньої і пізньої фази під впливом габапентину і прегабаліну 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%, $p > 0,05$), топірамату (29%, $p > 0,05$) і натрію вальпроату (24%, $p > 0,05$), носило характер помірної тенденції (табл. 4.7).

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 (табл. 4.7).

Як зазначає Н.А. Барінов (2007), на тепловий стимул реагують 4 види ваніллоїдних терморекцепторів: TRPV-4 і TRPV-3 рецептори, які активуються при температурі 27-35°C і 34-38°C відповідно в закінченнях Руффіні, зв'язаних з мієлінізованими A δ -аферентами, та TRPV-2 і TRPV-1 рецептори, які активуються при температурі більше 43°C і вище 52°C відповідно на мембранах ноцицепторів немієлінізованих C-аферентів. Пошкодження A δ -аферентів при невропатії приводить до втрати гальмівних впливів на спинальному рівні та зміні теплового больового порогу. Тому біль виникає у зв'язку з подразненням TRPV-1 рецепторів при більш низькій, ніж в нормі, температурі внаслідок порушення центрального гальмування [296]. Ймовірно, курсове введення тест-зразків сприяло відновленню структурної організації мієлінізованих A δ -аферентів, пов'язаних з ваніллоїдними терморекцепторами TRPV-4 і TRPV-3, нормалізуючи гальмівні впливи на спинальному рівні і викликаючи центральну модифікацію полімодального сенсорного імпульсу.

Отже, 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.

Максимальна вираженість терапевтичного ефекту габапентину і прегабаліну пояснюється, перш за все, 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 [296]. До того ж, антиноцицептивні ефекти зазначених препаратів можуть обумовлюватися гальмуванням вивільнення збуджуючих амінокислот з пресинаптичних закінчень [296], оскільки при більшості клінічних форм невропатичного болю канали NMDA-рецепторів повністю відкриті, що сприяє кальцієвому інфлюксу, підвищенню нейрональної збудливості та генної експресії, внаслідок чого розвивається нейрональна сенситизація, алодинія і гіпералгезія [296].

4.6. Комп'ютерне моделювання взаємодії метилпреднізолону (базова гормонотерапія експериментального алергічного енцефаломієліту) та габапентину (ад'ювантного засобу знеболюючої терапії): особливості використання в одній лікарській формі

Згідно результатів наших попередніх експериментальних досліджень встановлено, що для корекції больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном за умов експериментального алергічного енцефаломієліту, серед засобів ад'ювантної знеболюючої терапії, доцільно рекомендувати, насамперед, антиконвульсанти габапентин та прегабалін, які виявляють виражену знеболюючу активність за умов ЕАЕ [132].

У зв'язку з вище зазначеним, метою роботи було прогнозування можливості комбінованого використання метилпреднізолону (як основного засобу базової терапії РС) та габапентину (як ефективного болетамуючого засобу) за умов ЕАЕ.

Аналіз кислотно-лужних властивостей проводився за допомогою програми ACD / pKa DB [211]. Молекулярна маса, розчинність, ліпофільність визначалися адитивними методами з використанням комп'ютерних програм

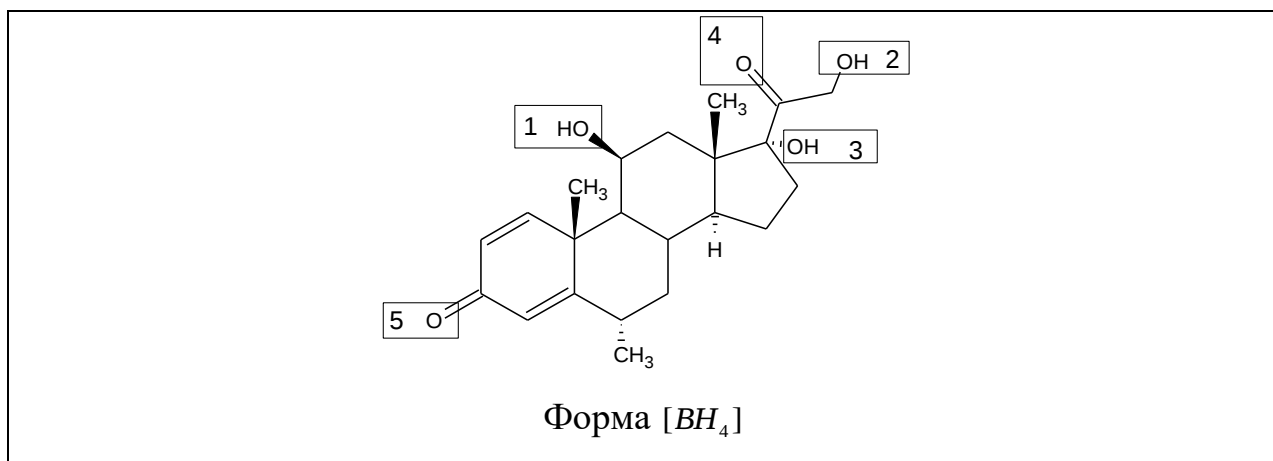
[244, 246, 306]. Типи біомішеней (рецептори, ферменти, транспортери) були визначені з використанням відповідних літературних джерел [57, 266].

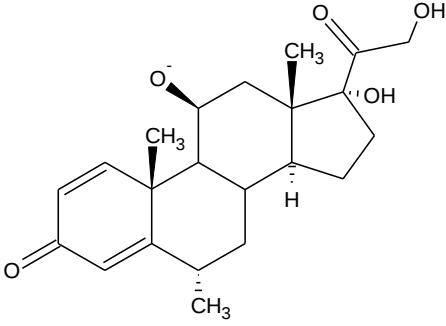
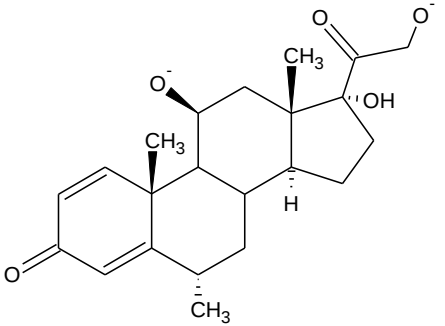
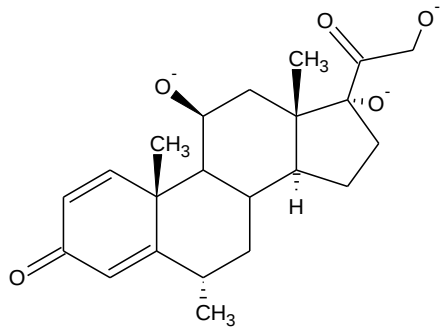
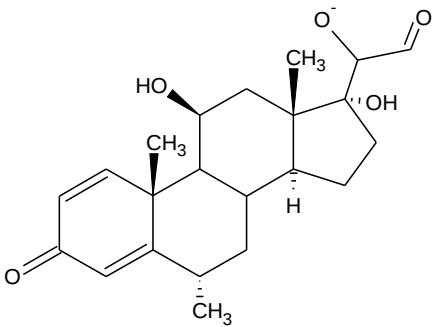
Взаємодія молекул на молекулярному рівні визначається їх хімічною будовою, наявністю і реакційною здатністю певних функціональних груп, враховуючи провідний характер електростатичної взаємодії (формування дисоціюючих солей / цвіттеріонів форм, протонування / депротонування в лімітуючих стадіях таутомірних перетворень тощо). Утворення катіонних / аніонних форм, залежне від умов рН середовища, слід визнати одним з провідних факторів, що обумовлюють можливість взаємодії розглянутих комбінаторних з'єднань.

В подальшому проведений аналіз функціональних груп та реакційної спроможності дослідних сполук. Так, у молекулі метилпреднізолону присутні п'ять потенційних функціональних груп - три гідроксильні (1-3) і дві карбонільні (4,5), що припускає можливість його протонування / депротонування і кислотно-лужні властивості. Рухливість протона зазначених гідроксильних груп, а також здатність до таутометрії сумарно припускають наявність існування п'яти протолітичних форм (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Структурна формула, функціональні групи та протолітичні форми метилпреднізолону



 Форма BH_2^-	 Форма BH_2^-
 Форма B^{3-}	 Форма (таутомер) BH_2^-

Високі значення констант іонізації наведених форм (табл. 4.9) вказують на переважне знаходження в неіонізованому вигляді, що відбивається на таких фізико-хімічних характеристиках, як коефіцієнти розподілу в системах, що містять гідрофільні і ліпофільні фази. Так, для неіонізованої форми (BH_3) величина ліпофільності ($\log P$) становить $1,99 \pm 0,54$, в результаті чого розрахована розчинність у воді, яка є найнижчою з усіх можливих протолітичних форм (0,13 г / л). Збільшення рН середовища і послідовне утворення заряджених форм (депротонування) призводять до збільшення гідрофільності молекули (внаслідок збільшення заряду і площі полярної поверхні, Δ^2), підвищенню розчинності у воді і пониженню величини $\log D$ (табл. 4.9) за рахунок збільшення кількості груп - акцепторів протонів.

Слід зазначити, що розглянуті гідроксильні групи характеризуються слабкою кислотністю - величини pK_a для них знаходяться вище 11, що обумовлено відсутністю суттєвих негативних індукційних ефектів та низькою рухливістю відповідних гідроксильних протонів. Як було зазначено

раніше, для метилпреднізолону можлива таутомерія, що приводить до утворення потенційної протолітичної форми BH_2^- (табл. 4.9); проте кислотність гідроксилу, що утворюється, статистично недостовірно відрізняється від величин pK_a інших гідроксильних груп.

Таблиця 4.9

Фізико-хімічні та кислотно-лужні властивості метилпреднізолону

	BH_2^-	BH^{2-}	(таутомер) BH_2^-	B^{3-}	BH_3
pK_a	14,59±0,7	12,98±0,1	12,48±0,7	13,14±0,2	-
Розчинність, г/л (25 °C)	60,4	1,01	0,31	1,4	0,13
$\log D (\log P)$	-0,69	1,08	1,6	0,47	1,99±0,54
Кількість донорів протону	0	1	2	3	3
Кількість акцепторів протону	5	6	7	8	9

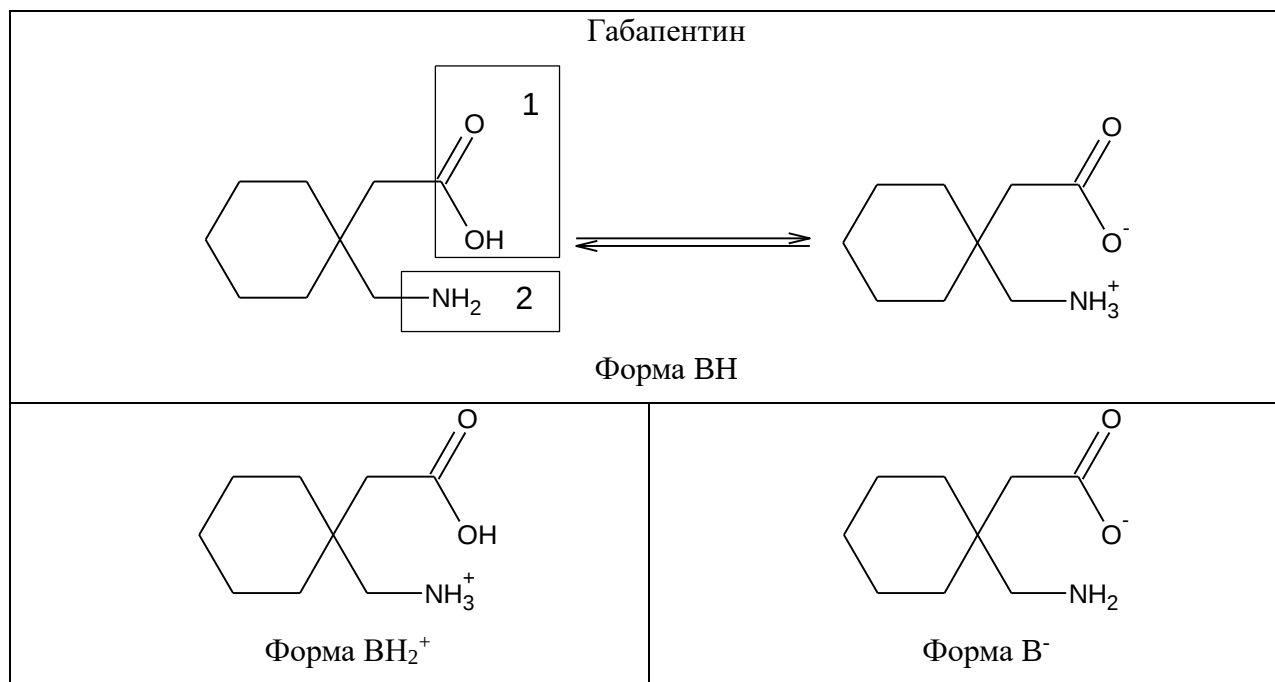
Можливість до таутомерії карбонільної групи в положенні 3 прегнанового скелету дуже низька, оскільки цей процес пов'язаний з труднощами при переході від конформації «крісла» цієї частини молекули до планарної ароматичної структури.

Габапентин є похідним γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) і, подібно всім амінокислотам, для нього властива утворення цвіттеріонів за рахунок кислого протона карбоксильної групи (pK_a 3,68 ± 0,1) і неподіленої електронної пари азоту аміногрупи (табл. 4.10). Лужність аміногрупи менше, ніж кислотність карбоксильної групи (pK_a становить 10,27 ± 0,29), тому при фізіологічних значеннях рН слід очікувати існування габапентину переважно

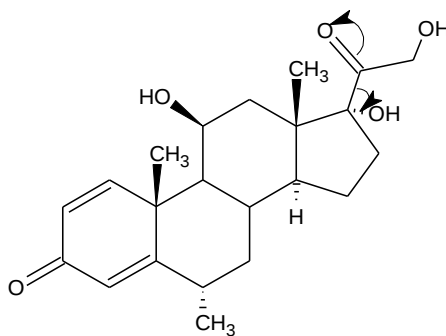
у вигляді протолітичної форми В- (табл. 4.11) гідрофільного характеру ($\log D = -1,6$).

Таблиця 4.10

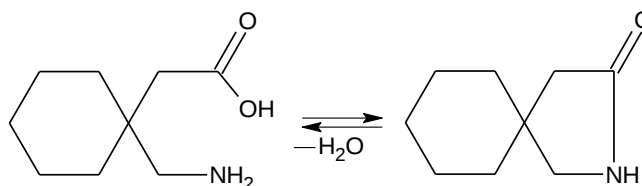
Структурна формула, функціональні групи та протолітичні форми габапентину



Наступним важливим етапом фармакокінетичного аспекту використання метилпреднізолону та габапентину став аналіз хімічних властивостей та можливої взаємодії. Гідроксильні групи в молекулі метилпреднізолону, як показано з розрахованих величин pK_a , мають слабку кислотність, тому можливість протікання реакцій алкілювання по них (припускаючи їх участь в реакціях нуклеофільного заміщення в якості алкоксиліруючих агентів) слід визнати мінімальною. Однак можливим є участь метилпреднізолону в реакціях нуклеофільного приєднання по карбонільній зв'язку аліфатичного заступника прегнанового кільця (положення 17):



Можливою реакцією габапентину є циклізація з утворенням циклічного 2-а спіро [4,5] декан-3-она:



Однак реакції такого типу протікають у присутності водовідштовхуючих засобів або при підвищеній температурі. Крім того, утворюється циклічний амід, здатний піддаватися зворотньому гідролізу з утворенням вихідної сполуки. Розташування аміногрупи в положенні «4» також зменшує можливість спонтанного декарбоксилювання.

Фармакологічна взаємодія розглянутих з'єднань може розвиватися на рівні зміни їх фармакокінетики (вплив на процеси всмоктування, розподілу, зв'язування з транспортними білками крові і компонентами тканин, конкуренція за специфічні системи метаболізму, і зміни кліренсу) і фармакодинаміки (вплив на суміжні або однакові рецепторні системи, потенціювання або зменшення фармакологічної відповіді через функціонального антагонізму).

У процесі всмоктування можуть впливати речовини, перенесення яких здійснюється однаковими транспортними системами і які подібні за хімічною будовою (володіють ізостеричною структурою). Найчастіше активний транспорт характерний для ендогенних сполук, що є невід'ємним компонентом життєдіяльності організму. З цієї позиції близькими до

природних сполук є метилпреднізолон (синтетичний аналог стероїдного гормону) та габапентин (амінокислотний фрагмент якого може переноситися за допомогою транспортерів аліфатичних незаряджених амінокислот і органічних аніонів OAT1, OAT2, OAT3 і OAT4).

Таблиця 4.11

Фізико-хімічні та кислотно-лужні властивості габапентину

	BH	BH_2^+	B^-
pK_a	-	3,68±0,1	10,27±0,29
Розчинність, г/л (25 °C)	90,8	16,23	16,33
$\log D (\log P)$	1,19	-1,52	-1,6
Кількість донорів протону	1	2	1
Кількість акцепторів протону	2	1	1

Фармакологічний тип взаємодії реалізується переважно через однакові (або пересічні) механізми дії, вплив на однакові рецепторні системи, пригнічення / індукцію синтезу ферментів, що регулюють метаболічні реакції. У зв'язку з цим необхідним є розгляд механізмів дії даних сполук.

Метилпреднізолон взаємодіє зі специфічними цитоплазматичними рецепторами, стимулює синтез специфічних мРНК та призводить до утворення ліпокортину, який гальмує активність фосфоліпази A2 і пригнічує вивільнення простагландинів, ендоперекисів, лейкотрієнів (фактори запалення). Пригнічує вивільнення циклооксигенази (ЦОГ), головним чином ЦОГ-2. Знижує проникність капілярів, викликає стабілізацію мембран і зменшення виділення протеолітичних ферментів. У високих дозах метилпреднізолон може підвищувати збудливість тканин мозку і сприяє зниженню порогу судомної готовності. Протишокову і антитоксичну дію пов'язують з підвищенням артеріального тиску (за рахунок збільшення концентрації циркулюючих катехоламінів та відновлення чутливості до них адренорецепторів, а також вазоконстрикції), зниженням проникності

судинної стінки, мембранопротекторними властивостями, активацією ферментів печінки, що беруть участь у метаболізмі ендо- та ксенобіотиків. Стимулює надлишкову продукцію соляної кислоти і пепсину в шлунку.

Габапентин за будовою схожий з ГАМК, проте його механізм дії відрізняється від інших препаратів, що взаємодіють з ГАМК-рецепторами (вальпроєва кислота, барбітурати, бензодіазепіни, інгібітори ГАМК-трансамінази, інгібітори захоплення ГАМК, агоністи ГАМК і пролікарські форми ГАМК). Він не володіє ГАМК-ергічними властивостями і не впливає на захоплення і метаболізм ГАМК. Механізмами дії габапентину при нейропатичному болю є зменшення глутамат-залежної загибелі нейронів, збільшення синтезу ГАМК, гальмування вивільнення нейротрансмітерів моноамінової групи. Габапентин в клінічно значущих концентраціях не зв'язується з рецепторами інших поширених препаратів або нейротрансмітерів, включаючи рецептори ГАМК_A, ГАМК_B, бензодіазепіну, глутамату, гліцину або N-метил-D-аспартату, проте надає модулюючий вплив на NMDA-рецептори, блокує $\alpha 2\delta$ -субодиницю кальцієвих каналів, перешкоджаючи взаємодії з тромбоспондіном, знижує вивільнення моноамінів, зменшує синтез і транспорт глутамату, сприяє зменшенню частоти потенціалів дії периферичних нервів.

Таким чином, виходячи з вищевикладеного, можна зробити висновок, що в представленій комбінації «метилпреднізолон-габапентин» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Спільне застосування метилпреднізолону і габапентину може призводити до зменшення терапевтичної дії останнього внаслідок підвищення порога судомної готовності мозку метилпреднізолоном [120, 124].

4.7. Оцінка ультраструктурних змін деяких утворень мозку на фоні введення антиконвульсантів за умов ЕАЕ

В групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином, як показали результати аналізу електронограм, цитоархітектоніка фронтальної кори головного мозку щурів в цілому збережена. Нами відмічалось зниження кількості апоптотично змінених нейронів 2-го і 3-го шарів кори в порівнянні до групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту, зі збереженої будовою ядер. Цитоплазма нейронів насичена канальцями і цистернами комплексу Гольджі з незначною кількістю аутофаголізосом. (рис. 4.7).

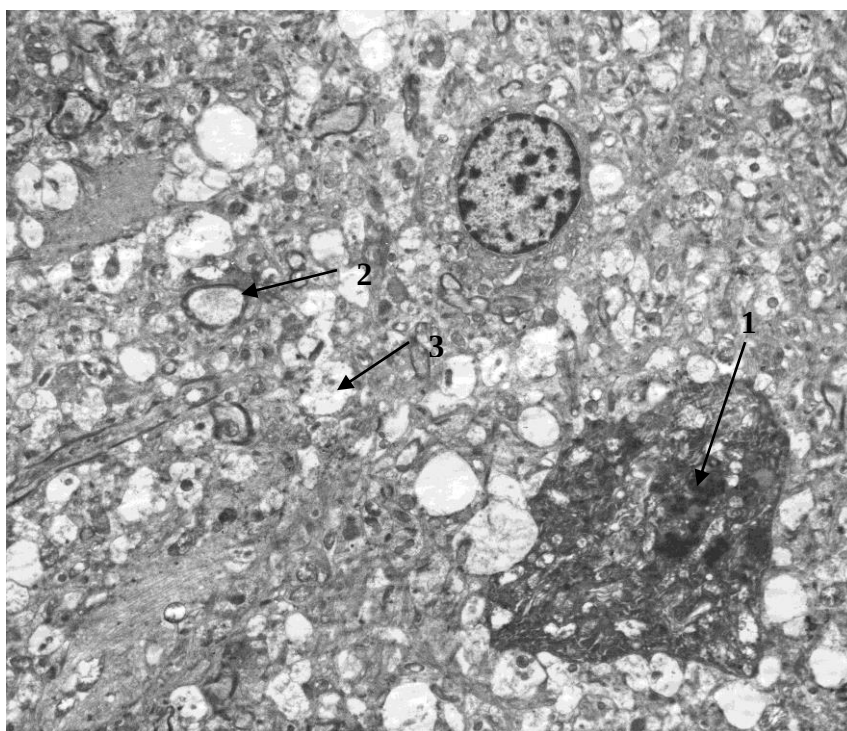


Рис. 4.7. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з мети преднізолоном та габапентином. 3б.х 5000.

Позначення:

1. цитоплазма нейрона;
2. мієлінове волокно зі збереженими нейрофіламентами;
3. безмієлінове волокно.

Перинейрональний набряк кори фронтальної долі головного мозку вданій експериментальній групі не виражений, без порушень структури аксо-соматичних синапсів. Ми спостерігали відростки астроцитів, прилеглі до стінок гемокапілярів, без порушень профілю і зі збереженою цитоплазмою. У деяких із них визначались скупчення аутофаголізосом, але пошкоджень шорсткого ендоплазматичного ретикулуму не зустрічалось. Плазматична мембрана, що обмежує астроцитарні відростки, виявляється безперервною (рис. 4.8).

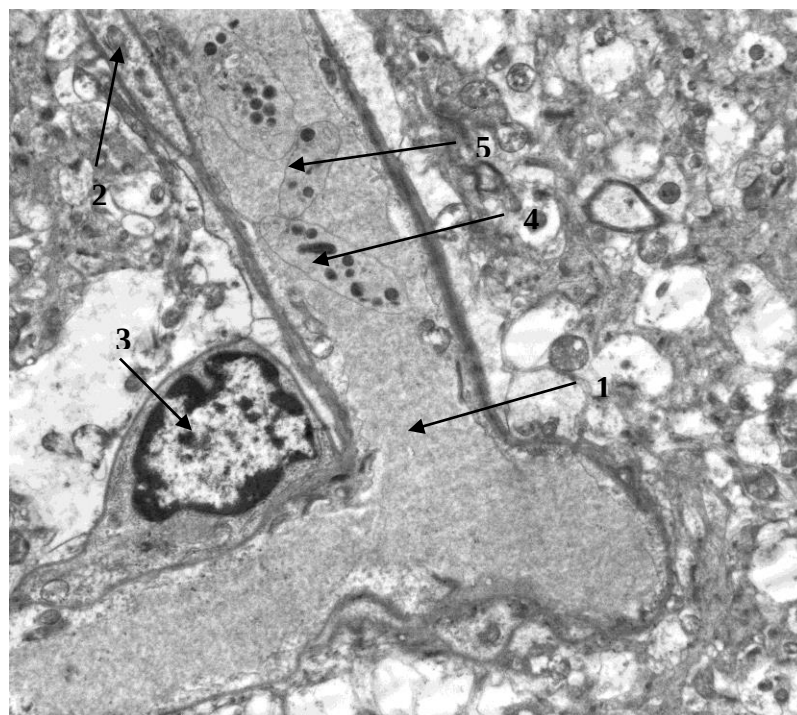


Рис. 4.8. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з мети преднізолоном та габапентином. 3б.х 8000.

Позначення:

1. просвіт венули;
2. ядро ендотеліоцита;
3. астроцит;
4. тромбоцити;
5. дегранульований тромбоцит

Нами також досліджувались астроцити та мікрогліюцити нервової тканини фронтальної долі головного мозку щурів. Мікрогліальні клітини як і

в попередніх дослідженнях, мали амебоїдну форму, в цитоплазмі визначались незначна кількість аутофаголізосом і щільні мітохондрії більшість з яких не мала ознак кристолізіса. Гіалоплазма насичена рибосомами, полісомами, елементами агранулярного ендоплазматичного ретикулуму. Ядра нейронів з високим вмістом еухроматину. У складі ядер олігодендроцитів периферичні ділянки хроматину мають чіткі контури, що вказує на відсутність початкових стадій каріолізісу. Відростки астроцитів і олігодендроцитів без виражених патологічних змін. Не зустрічались ділянки лізісу в мієлінізованих волокнах, проте демієлінізовані волокна зберігали ознаки фрагментації нейрофібрил. Більшість локусів демієлінізації волокон розташовані поблизу мікросудин (рис. 4.9).

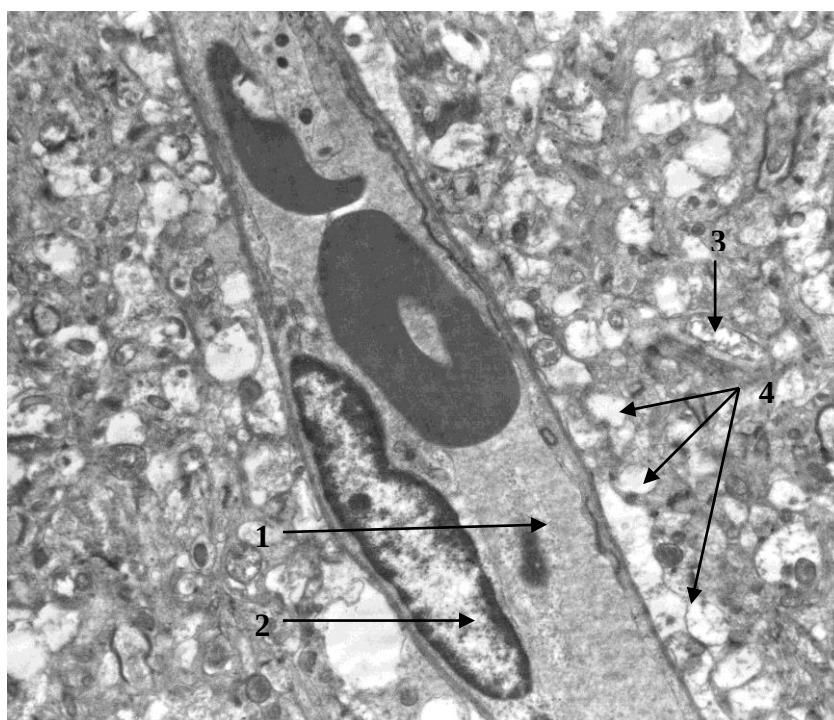


Рис. 4.9. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином. 36.x 8000.

Позначення:

1. Просвіт артеріоли з форменими елементами крові;
2. ядро ендотеліоцита;
3. мітохондрія;
4. демієлінзовані волокна.

Просвіти гемокапілярів кори фронтальної долі мозку в даній групі експерименту не були звужені або деформовані. У більшості спостережень в групі моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином плазматичні мембрани еритроцитів не виявляли розпушеності мембран або інших пошкоджень. Зберігалась будова люмінальної поверхні ендотеліальних клітин мікросудин, витончень цитоплазми не спостерігалось. Перицити в безпосередній близькості до описаних ділянок ендотеліальних клітин мають знижену електронну щільність і об'єднані з базальними мембранами. Цитоплазма ендотеліальних клітин в зоні органел зберігає типову для неї структуру, містить профілі мітохондрій і рибосом. Ядра ендотеліальних клітин незначно збільшені, наповнені значною масою гетерохроматина, містять ядерце, мембрани каріотеки без розпушень. Навколо артеріол і венул спостерігаються зони периваскулярного набряку.

В нервовій тканині головного мозку щурів групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином порушення ультраструктури нейронів гіпокампу були слабо виражені. Відсоток нейронів з ознаками некробіотичних апоптотичних змін досить незначний. Більшість нейроцитів мали ядра без ознак порушень функціональної активності. В даній групі досліджень не зустрічались явища хроматолізу на відміну від групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту. Поблизу - підвищена кількість лізосом різного ступеня зрілості, мультивезикулярних тілець і дрібних осміофільних включень. В ЕПР - масивне утворення вакуоле-подібних цистерн (рис. 4.10).

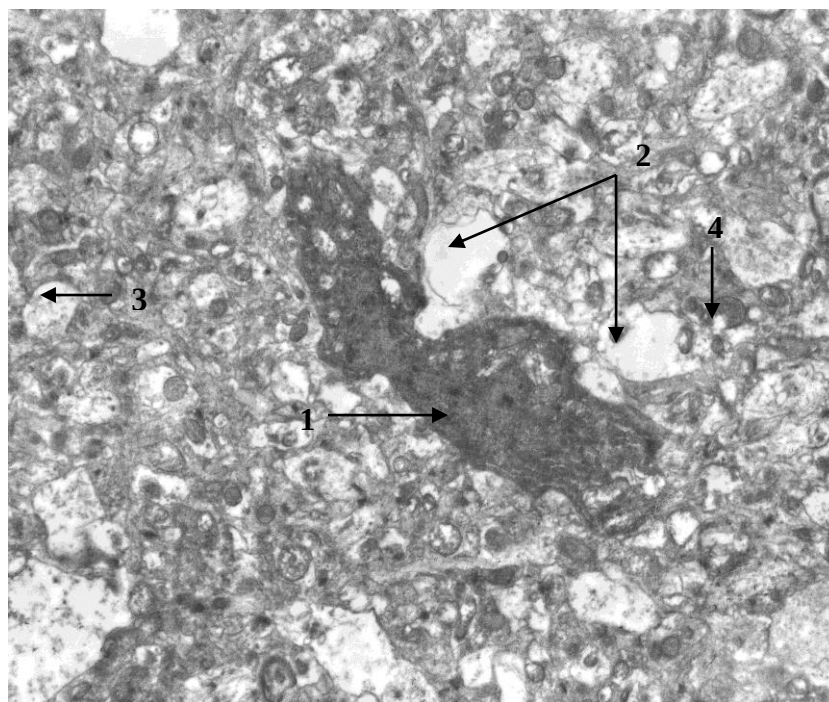


Рис. 4.10. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином. Зб.х 8000.

Позначення:

1. цитоплазма нейрона;
2. вакуольна дистрофія;
3. нейрофібрили;
4. ушкоджена мітохондрія.

Структура мітохондрій в нейронах гіпокампу з незначними ушкодженнями, спостерігаються мітохондрії збільшені в розмірах, але без фрагментації зовнішньої мембрани, зі збереженими кристами. Набряку матриксу мітохондрій був незначний, що призводило до відсутності гігантських розмірів. Ядра і цитоплазма астроцитів - помірної електронної щільності, зі нормальним наповнення ендоплазматичним ретикуломом гранулярного типу, рибосомами, полісомами, мітохондріями, дрібнозернистої гіалоплазми. Канальці агранулярного ЕПР незначно розширені і частково заповнені електроннощільними масами. Відростки астроцитів наповнені дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами, мітохондріями (рис. 4.11).

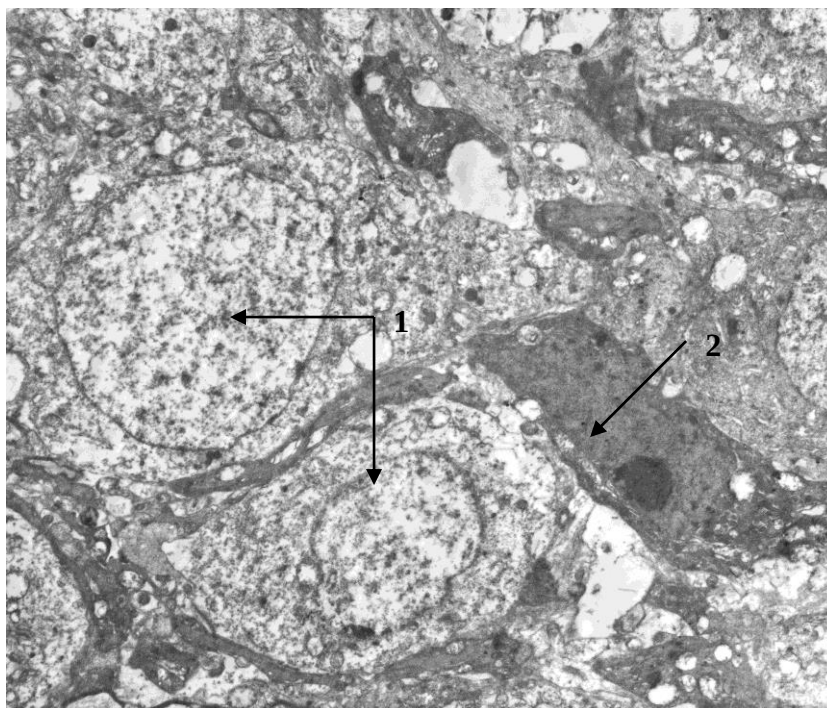


Рис. 4.11. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту з метилпреднізолоном та габапентином. 36.x 5000.

Позначення:

1. протоплазматичні астроцити нервової тканини;
2. ядро нейрону.

Як показали ультрамікроскопічні дослідження олігодендроцитів гіпокампу в даній експериментальній групі наповненість клітин цитоплазматичними органелами близька до норми, ядра містять помірну кількість еухроматину, зовнішня ядерна мембрана зрідка утворює трубочки великого діаметра, які простягаються в цитоплазму.

У більшості мієлінових нервових волокон відсутні дегенеративні зміни, набряки аксолеми поодинокі. Безмієлінові нервові волокна - без патологічних змін. Нами визначались відновлення асиметрично розподіленої електронної густини в структурі мієліну, що підвищує ізоляцію аксона і створює умови для адекватного проведення імпульсу. Значно рідше, порівняно з групою експериментального алергічного енцефаломієліту, спостерігались випадки з локальними розпушенням і разволокненням завитків мезаксону, що

розцінювалось нами як компенсаторна дія метилпреднизолону та габапентину на розвиток експериментального алергічного енцефаломієліту.

Стінка гемокапілярів і артеріол в даній експериментальній групі – без істотних патоморфологічних ознак, хоча в стінці венул спостерігається часткова деструкція періцитів і базальних мембран. Перивенулярний набряк, характерний для змін в групі експериментального алергійного енцефаломієліту, в даній групі був значно нижчий, що також підтверджує позитивну дію досліджуваних речовин на стан мікросудин головного мозку при експериментальному алергічному енцефаломієліті.

4.8. Резюме

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз нейротропних ефектів антиконвульсантів (вплив на больову і тактильну чутливість, поведінкові реакції) та антиоксидантних властивостей і змін інтенсивності процесів ПОЛ у корі, стовбурі та спинному мозку за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні базової терапії метилпреднізолоном.

Аналіз отриманих результатів, описаних у цьому розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Інокуляція енцефалітогенної суміші на 9 - 11 добу викликає розвиток ЕАЕ, який сприяє розвитку порушень орієнтовно-дослідницької активності, нейрональної сенситизації, алодинії та гіпералгезії, а також зниженню м'язової сили у експериментальних тварин.

2. На фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном за умов експериментального алергічного енцефаломієліту максимально виражену знеболюючу активність виявляють габапентин і прегабалін.

3. За умов ЕАЕ антиконвульсанти не здатні повністю усувати дефіцит рухової активності, але нормалізують дослідницьку діяльність. При цьому найбільш виражений вплив щодо нормалізації поведінкових реакцій,

порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення габапентину і прегабаліну.

4. Курсове застосування карбамазепіну, топірамату, натрію вальпроату, габапентину і прегабаліну за умов ЕАЕ-індукованого невропатичного больового синдрому викликає нормалізацію тактильної і больової чутливості різного ступеню вираженості.

5. Здатність послаблювати прояви невропатичного больового синдрому за умов експериментального еквіваленту РС зменшується в ряду габапентин $\geq$ прегабалін $>$ натрію вальпроат $\geq$ топірамат $>$ карбамазепін.

6. У комбінації «метилпреднізолон-габапентин» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Спільне застосування метилпреднізолону і габапентину може призводити до зменшення терапевтичної дії останнього внаслідок підвищення порога судомної готовності мозку метилпреднізолоном.

7. Доведено, що згідно результатів електрономорфологічного дослідження експериментальна ад'ювантна знеболююча терапія габапентином на фоні базового лікування глюкокортикостероїдом у щурів з ЕАЕ виявляє значно нижчий перивенулярний набряк, характерний для змін в групі експериментального алергійного енцефаломієліту, що також підтверджує позитивну дію досліджуваних речовин на стан мікросудин головного мозку при експериментальному алергічному енцефаломієліті.

РОЗДІЛ 5

ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ АНТИДЕПРЕСАНТІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

Одним з маловивчених клінічних розділів розсіяного склерозу (РС) є проблема больового синдрому, який найчастіше розцінюється як нетипові прояви демієлінізуючого процесу при РС. У ранніх роботах по розсіяному склерозу цій проблемі не приділялося достатньої уваги, хоча у частини пацієнтів біль описували, як супутній симптом. Однак публікації останніх років показують, що біль є частим і практично постійним симптомом захворювання. За даними різних авторів, натеper частота хронічних больових синдромів у пацієнтів з РС досягає 50-80% [117, 283, 318]. При цьому хворі РС при наявності хронічної болю більш інвалідизовані та соціально дезадаптовані, ніж пацієнти з аналогічним неврологічним дефектом, але без больового синдрому [5, 110, 318].

Тривалий біль характеризується прогресуючим зростанням впливу психологічних факторів на механізми формування ноцицептивної відповіді. Формування хронічного болю більше залежить від комплексу психологічних факторів, ніж від характеру та інтенсивності периферичного впливу. Варіантом хронічного болю є психогенні болі, коли периферичний вплив може бути відсутнім взагалі або ж відігравати роль пускового або сприяючого фактору [293].

У формуванні хронічного болю особливу роль відіграє депресія; синдром, що виникає на її фоні, позначають як «депресія-біль». Часто депресія протікає приховано, не усвідомлюється самими пацієнтами, і єдиним її проявом може бути хронічний біль. У свою чергу, хронічний біль є

«улюбленою» маскою прихованої депресії. Тісний зв'язок депресії з хронічним болем пояснюється спільними біохімічними механізмами.

Відомо, що при онкологічних захворюваннях, при захворюваннях суглобів, розсіяному склерозі тощо має місце розвиток хронічного больового синдрому. Проте за зазначених умов слід врахувати можливість виникнення і синдрому «депресія-біль» [318].

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльний аналіз 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.

5.1. Порівняльна характеристика знеболюючої активності антидепресантів у інтактних тварин та за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на тлі базової терапії метилпреднізолоном

Дослідження виконані на білих нелінійних щурах масою 190-230 г, які утримувались у стандартних умовах віварію ДЗ «ДМА МОЗ України» [192]. Оцінку знеболюючого потенціалу антидепресантів проводили шляхом вивчення їх антиноцицептивної активності у інтактних тварин та реєстрації ноцицептивної відповіді (реакція вокалізації) за умов сформованого ЕАЕ при одноразовому введенні засобів на тлі 5-денної терапії метилпреднізолоном за методом електричного подразнення кореня хвоста щурів (докладний опис представлений в розділі 2).

На I етапі чинного дослідження інтактних тварин методом випадкової вибірки розділили на експериментальні групи по 10 гризунів, яким одноразово інтрагастрально вводили досліджувані засоби у нижче зазначених дозах: I група – пасивний контроль (інтактні); II група –

метилпренізолон (М); III група – М + амітриптилін (10 мг/кг), IV група – М + флуоксетин (25 мг/кг), V група – М + тразодон (40 мг/кг) та VI група – М + пароксетин (8 мг/кг).

Показано, що показники больового порогу у вихідному стані реєструвались в межах від $1,76 \pm 0,08$ В (гр. I) до $1,95 \pm 0,10$ В (гр. IV). При цьому на фоні введення всіх досліджуваних засобів максимальний розвиток знеболюючої дії спостерігався на 90 хвилині. Однак при застосуванні амітриптиліну та флуоксетину їх анальгетичний потенціал продовжував реєструватись достатньо високим ($+107,06\%$, $p \leq 0,05$) та $+114,2\%$, $p \leq 0,05$ відповідно) і на 120 хвилині експерименту у порівнянні з показниками вихідного стану (табл. 5.1. та рис. 5.1).

Таблиця 5.1

Вплив внутрішньошлункового введення антидепресантів на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста у інтактних тварин (n=10)

Досліджувані засоби	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості (ПБЧ), В ($M \pm m$)				
		BC	30 хв.	60 хв.	90 хв.	120 хв.
Контроль (фізіол. р-н)	0,1 мл / 100 г	$1,76 \pm 0,08$	$1,92 \pm 0,08$	$1,65 \pm 0,10$	$1,50 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,10$
Амітриптилін	150	$1,84 \pm 0,15$	$2,15 \pm 0,08$	$2,97^{*\square} \pm 0,13$	$3,53^{*\square} \pm 0,13$	$3,81^{*\square} \pm 0,09$
Флуоксетин	300	$1,79 \pm 0,13$	$2,82^{*\square} \pm 0,13$	$3,68^{*\square} \pm 0,35$	$4,40^{*\square} \pm 0,27$	$3,25^{*\square} \pm 0,31$
Тразодон	155	$1,60 \pm 0,12$	$2,50^{*\square} \pm 0,14$	$3,50^{*\square} \pm 0,37$	$4,18^{*\square} \pm 0,60$	$2,76^{*\square} \pm 0,19$
Пароксетин	100	$1,62 \pm 0,13$	$2,47^{*\square} \pm 0,20$	$3,18^{*\square} \pm 0,31$	$4,43^{*\square} \pm 0,45$	$4,31^{*\square} \pm 0,43$

Примітки:

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до ПБЧ у вихідному стані (BC);

$\square$ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи пасивного контролю.

Отже, щодо здатності блокувати проходження електричного подразнення у інтактних тварин на піку розвитку знеболюючої дії (90

хвилина тестування) антидепресанти розташувалися у наступному порядку: флуоксетин (+153,1%) ≥ пароксетин (+125,9%) ≥ тразодон (+98,46%) ≥ амітриптилін (+91,84%).

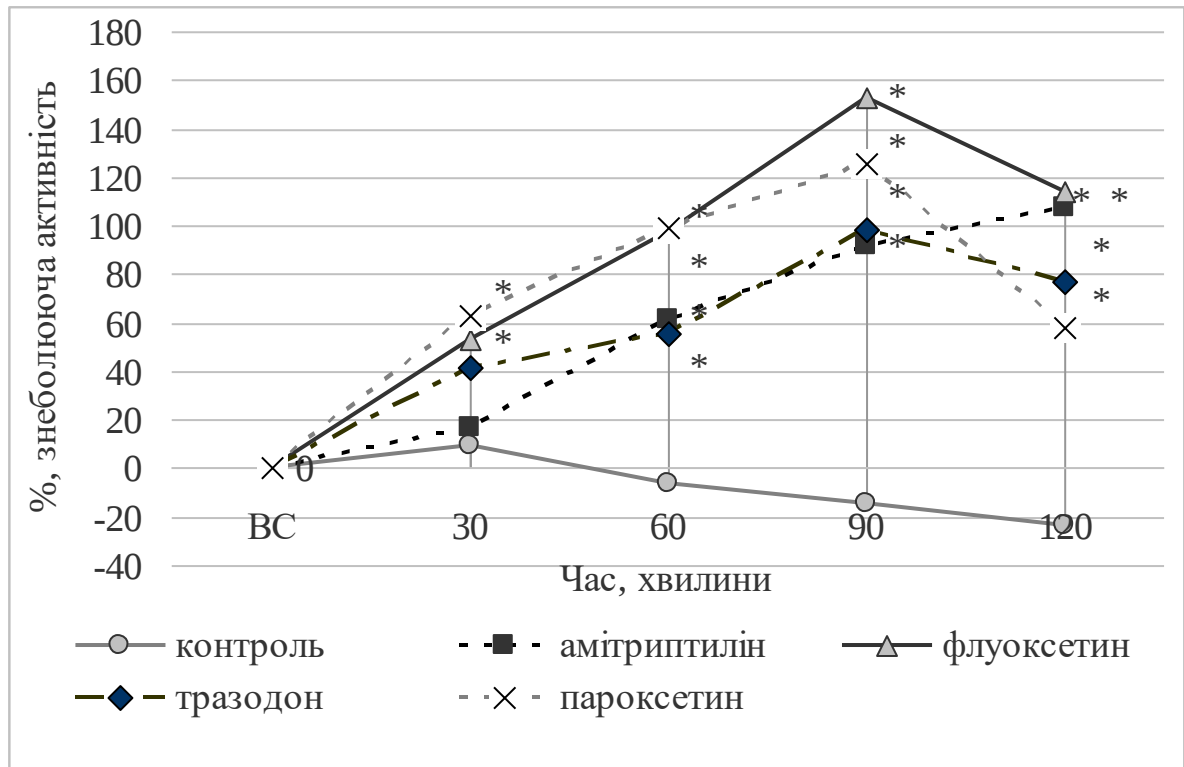


Рис. 5.1. Зміни знеболюючого потенціалу антидепресантів у інтактних тварин

Примітка. * - $p \leq 0,05$ по відношенню показників вихідного стану.

На II етапі чинного дослідження шляхом введення енцефалітогенної суміші в основу хвоста щурів відтворювали ЕАЕ: пік змін у тварин формувався на 11 добу дослідження; протягом наступних 5 днів щури отримували метилпреднізолон в дозі 3,4 мг/кг в якості засобу базової патогенетичної терапії.

Тварин методом випадкової вибірки розділили на 6 дослідних груп ($n=10$), котрим одноразово внутрішньошлунково вводили антидепресивні засоби за умов сформованого ЕАЕ: I група – активний контроль (ЕАЕ); II група – ЕАЕ + метилпреднізолон (М); III група – ЕАЕ + М + амітриптилін (10

мг/кг), IV група – ЕАЕ + М + флуоксетин (25 мг/кг), V група – ЕАЕ + М + тразодон (40 мг/кг) та VI група – ЕАЕ + М + пароксетин (8 мг/кг).

Встановлено, що у вихідному стані за умов сформованого ЕАЕ на тлі базової терапії метилпреднізолоном реакція на електричне подразнення хвоста у щурів всіх груп реєструвалась на рівні від $1,35 \pm 0,12$ В (гр. IV) до $1,48 \pm 0,1$ В (гр. III). Результати оцінки знеболюючої активності досліджуваних засобів на 90 хвилині тестування представлені в табл. 5.2 і на рис. 5.2.

Таблиця 5.2

Вплив внутрішньошлункового введення антидепресантів на рівень больового порогу (В) при електричному подразненні кореня хвоста тварин за умов ЕАЕ на тлі терапії метилпреднізолоном (n=10)

Досліджувані комбінації	Доза, мг/кг	Показники порогу больової чутливості, В ($M \pm m$)	
		ВС	90 хв.
ЕАЕ, контроль (фіз. р-н)	0,1 мл/100 г	$1,03 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,13$
ЕАЕ + М + Амітриптилін	3,4 + 10	$1,36 \pm 0,06$	$3,62^{\square} \pm 0,50$
ЕАЕ + М + Флуоксетин	3,4 + 25	$1,48 \pm 0,06$	$4,05^{\square} \pm 0,18$
ЕАЕ + М + Тразодон	3,4 + 40	$1,35 \pm 0,12$	$4,20^{\square} \pm 0,35$
ЕАЕ + М + Пароксетин	3,4 + 8,0	$1,36 \pm 0,11$	$3,25^{\square} \pm 0,37$

Примітка.

$\square$ - $p \leq 0,05$ у порівнянні з показниками групи активного контролю.

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 166,2% ($p \leq 0,05$) щодо показників вихідного стану.

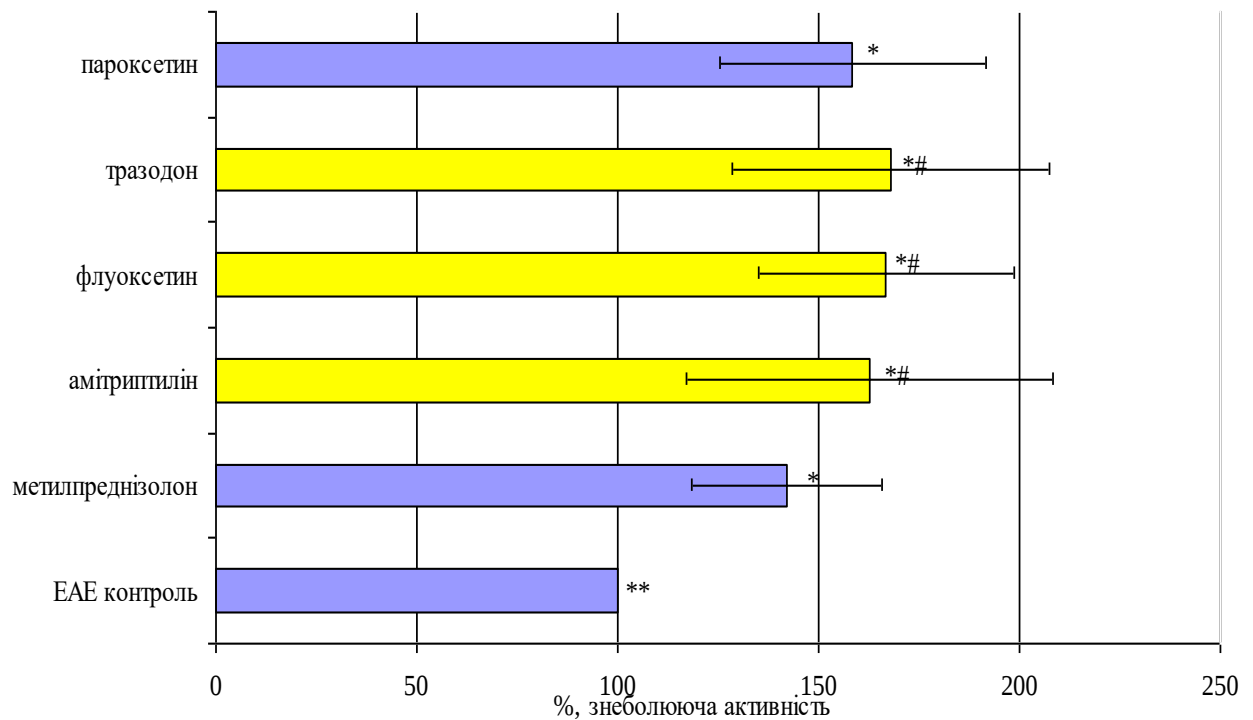


Рис. 5.2. Зміни антиноцицептивного потенціалу антидепресантів при електоподразненні кореня хвоста щурів за умов EAE (90 хвилина) на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.

Примітки:

- * - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи активного контролю (EAE);
- ** - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи пасивного контролю (інтактні);
- # - міжгрупові порівняння із використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, критерій Дункана.

Отже, для корекції синдрому «біль-депресія» на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном доцільно рекомендувати антидепресанти, насамперед, амітриптилін, флуоксетин та тразодон, які виявляють виражену знеболюючу активність за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу [112, 122, 148, 149].

5.2. Вплив антидепресантів на поведінкові реакції щурів за умов експериментальної патології

Відомо, що у хворих на розсіяний склероз (РС) відзначається надзвичайним поліморфізмом психічних порушень з широким спектром психопатологічних явищ - від невротичних розладів до психотичних станів депресивного характеру [36, 38]. Серед нейропсихічних порушень слід перш за все виділити зниження інтелекту, порушення поведінки, сповільненість інтелектуальних та емоційних функцій, зниження пам'яті, депресію, відчуття неспокою, що визначає наукову та практичну значимість системних порівняльних фармакологічних досліджень механізмів активності лікарських засобів (в т.ч. ад'ювантної терапії) і створює теоретичні передумови оптимізації фармакотерапії нейропсихічних розладів у хворих на РС.

В даному підрозділі представлені результати оцінки впливу антидепресантів (амітриптиліну, флуоксетину, тразодону та пароксетину) на поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.

Показано, що у вихідному стані тварини всіх дослідних груп були досить активними: показники моторно-дослідницької та емоційної активності коливалися в межах фізіологічної норми для гризунів відповідної вікової групи (табл. 5.3.).

Таблиця 5.3

Поведінкові реакції щурів у тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ на фоні сумісного введення антидепресантів з метилпреднізолоном (n=10)

Експериментальна група	Критерії оцінки в тесті «відкрите поле»	Показники ($M \pm m$)		
		Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
1	2	3	4	5
ЕАЕ	квадрати	25,17±1,75	4,50±0,71	12,33±1,52
	нірки	8,33±1,08	2,50±0,22	2,50±0,67
	стійки	7,00±0,73	1,00±0,36	1,66*±0,49
	грумінг	1,50±0,22	0,66±0,21	0,83±0,16
	болюси	0,83±0,30	0,50±0,22	1,16±0,16

Продовження таблиці 5.3

1	2	3	4	5
ЕАЕ + Метилпреднізолон (М)	<i>квадрати</i>	28,83±3,0	11,33*±1,33	25,16±2,92
	<i>нірки</i>	9,16±0,74	2,33*±0,49	5,00*±1,03
	<i>стійки</i>	9,33±1,62	1,83*±0,16	8,16±1,27
	<i>грумінг</i>	2,66±0,61	0,50*±0,22	1,33±0,49
	<i>болюси</i>	1,66±0,33	1,33±0,64	1,50±0,42
ЕАЕ +М+ Амітриптилін	<i>квадрати</i>	22,0±1,42	4,83*±0,70	12,33*±1,52
	<i>нірки</i>	6,0±0,36	1,33*±0,42	2,50*±0,67
	<i>стійки</i>	5,0±0,51	0	1,66*±0,49
	<i>грумінг</i>	1,16±0,47	0,83±0,16	0,83±0,16
	<i>болюси</i>	1,0±0,25	0,83±0,16	1,16±0,16
ЕАЕ +М+ Флуоксетин	<i>квадрати</i>	31,83±5,26	11,0*±1,4	15,50*±1,11
	<i>нірки</i>	9,16±0,98	3,16±0,60	4,16*±0,83
	<i>стійки</i>	15,33±1,85	2,83*±0,30	1,50*±0,56
	<i>грумінг</i>	1,0±0,36	1,0±0,36	2,16*±0,30
	<i>болюси</i>	0,83±0,40	1,66±0,33	1,16±0,30
ЕАЕ +М+ Тразодон	<i>квадрати</i>	30,83±5,04	5,83*±0,60	15,0*±1,89
	<i>нірки</i>	7,33±1,14	3,66*±0,55	4,16*±0,54
	<i>стійки</i>	7,16±0,54	1,16*±0,30	4,0*±0,85
	<i>грумінг</i>	2,16±0,60	1,16±0,30	3,0±0,36
	<i>болюси</i>	0,66±0,21	1,0±0,25	0,83±0,30
ЕАЕ +М+ Пароксетин	<i>квадрати</i>	26,16±2,9	9,50*±1,25	11,5*±1,54
	<i>нірки</i>	7,83±1,19	3,33*±0,61	3,50*±0,67
	<i>стійки</i>	7,83±1,07	1,33*±0,61	2,83*±0,30
	<i>грумінг</i>	2,0±0,36	1,0±0,36	1,50±0,42
	<i>болюси</i>	1,5±0,56	1,33±0,42	1,50±0,50

Примітка. * - $p \leq 0,05$ – по відношенню до показників вихідного стану.

Встановлено, що у 100% тварин усіх дослідних груп зміни рухово-дослідницької активності в тесті «відкрите поле» на 12 добу моделювання ЕАЕ мали однакову спрямованість. Зокрема, кількість перетнутих квадратів зменшилась у 2,9 разів для групи III (флуоксетин) та у 5,6 разів для групи I (контроль); кількість заглядань у «нірки» знизилась у 2 рази для групи IV (тразодон) та у 5,5 разів для групи II (амітриптилін) порівняно з показниками вихідного стану. Число вертикальних підйомів у цей період експерименту зменшувалося у 5,4 разів для гр. III (флуоксетин) та у 2,6 разів для гр. II (амітриптилін) порівняно з показниками вихідного стану. При цьому

емоційний стан тварин оцінювався як тривожний з ознаками седації: кількість актів грумінгу та болюсів була статистично значимо меншою у всіх дослідних групах порівняно з показниками вихідного стану.

Аналізом дослідницької активності показано, що на 12 день моделювання ЕАЕ кількість заглядань у «нірки» та стійок зменшилась на 74,57% ($p \leq 0,05$) та 80,40% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками вихідного стану. Проте на фоні 5-денного введення метилпреднізолону показник частоти вертикальних підйомів майже повернувся до показника вихідного стану, хоча кількість заглядань у «нірки» ще залишалась зниженою у 1,8 рази ($p \leq 0,05$) (рис. 5.3).

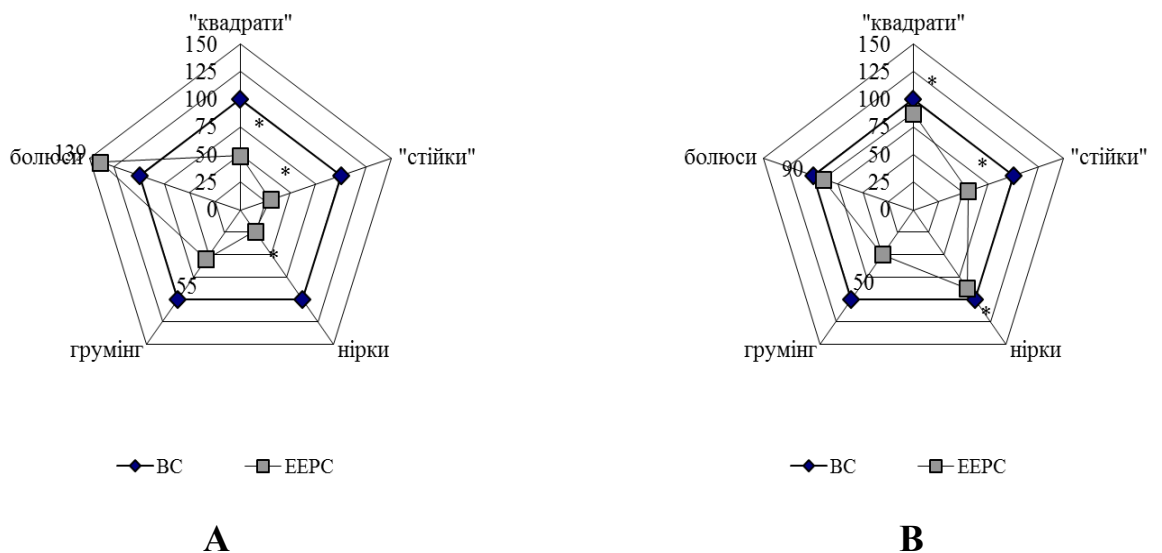


Рис. 5.3. Зміни поведінкових реакцій щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група контролю;

В – група метилпреднізолону.

Встановлено, що одноразове внутрішньошлункове введення амітриптиліну на фоні 5-денного застосування метилпреднізолону викликало загальну гіпокінезію у тварин: наприкінці досліду число перетнутих горизонталей складало 56,04%, заглядань у «нірки» – 41,66%, вертикальних стійок – 33,2% щодо показників вихідного стану, прийнятих за 100%. При цьому за умов введення флуоксетину рухова активність залишалась

зниженою на 51,3%, а вертикальні підйоми спостерігались у 10,22 разів рідше у порівнянні з показниками вихідного стану (рис. 5.4).

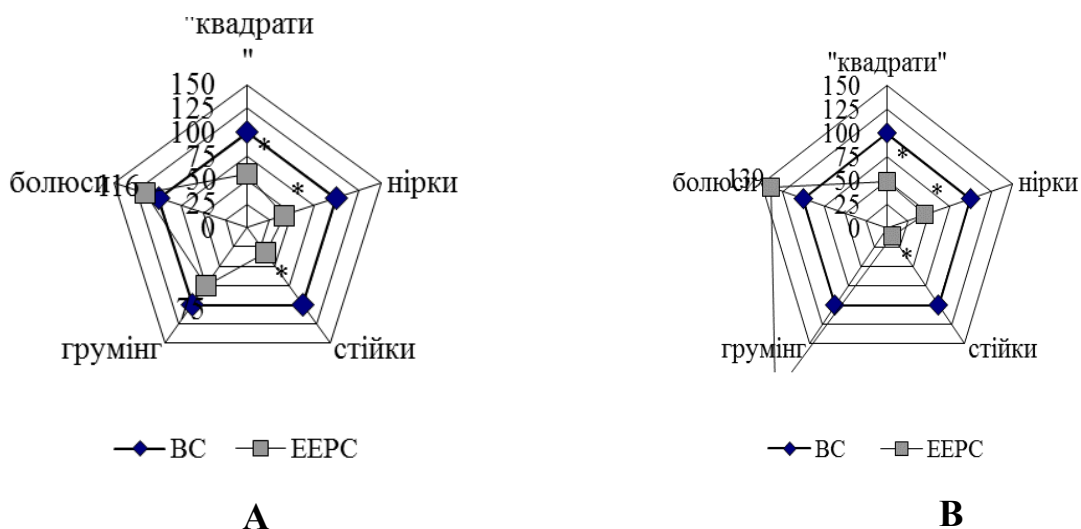


Рис. 5.4. Зміни поведінкових реакцій щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група М + амітриптилін;

В – група М + флуоксетин.

Показано, що на фоні застосування композиції М+тразодон спостерігалась більш виражена позитивна динаміка щодо нормалізації рухової активності: кількість перетнутих квадратів збільшилась у 3 рази ($p \leq 0,05$) у порівнянні з 12 днем моделювання експериментальної патології (рис. 5.5). Введення пароксетину також сприяло збільшенню числа перетнутих горизонталей у даний період тестування, яке все ж залишалось нижчим, ніж у вихідному стані. Крім того, в цих експериментальних групах спостерігалася позитивна динаміка змін дослідницької активності: так, кількість вертикальних стійок збільшилася майже у 3,4 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками 12 доби експерименту для групи тразодону. Подібна динаміка зареєстрована також щодо числа заглядань у «нірки»: для групи тразодону – у 1,1 рази ($p \geq 0,05$) та для групи амітриптиліну - у 1,3 рази ($p \geq 0,05$).

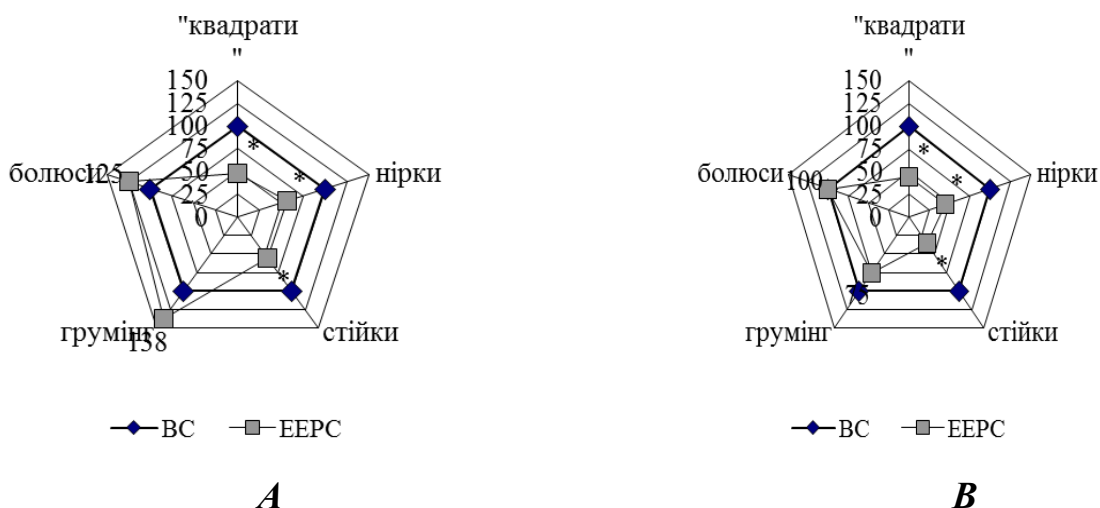


Рис. 5.5. Зміни поведінкових реакцій щурів в тесті «відкрите поле» за умов ЕАЕ

Примітки:

А – група М + trazодон;

В – група М + пароксетин.

Продемонстрований позитивний вплив антидепресантів на емоційну активність тварин з модельованим ЕАЕ. Так, за умов введення флуоксетину кількість актів грумінгу та болюсів збільшилася майже у 2 рази порівняно з показниками вихідного стану: тварини були спокійними, проявів тривоги не спостерігалось. Зазначено, що при введенні пароксетину число проявів грумінгу та болюсів дефекацій практично відновлювалося до показників емоційної активності, зареєстрованих на початку експерименту.

Отже, за умов ЕАЕ антидепресанти не здатні повністю усувати дефіцит рухової активності, але нормалізують дослідницьку діяльність у щурів в тесті «відкрите поле». При цьому за даних умов експерименту практично повністю відновлюються показники емоційної активності. Найбільш виражений вплив антидепресантів щодо нормалізації поведінкових реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення trazодону та пароксетину [135, 137, 147, 297].

5.3. Оцінка змін м'язової сили під впливом комбінацій метилпреднізолону з антидепресивними засобами за умов ЕАЕ

Результатами проведених досліджень показано, що за умов ЕАЕ у тварин реєструвалися зміни м'язової сили як у вихідному стані, так і 12-ї та 17-ї доби формування процесів демієлінізації. Зокрема, у вихідному стані час, протягом якого щури «зависали» на спеціальному стержні (показник м'язової сили), складав від $10,6 \pm 1,50$ сек (гр. V) до $13,6 \pm 1,71$ сек (гр. I). При цьому вже 12-ї доби формування ЕАЕ спостерігалось статистично значиме зменшення м'язової сили в середньому в 1,5 – 2,5 рази для всіх досліджуваних груп (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Зміни м'язової сили щурів за умов моделювання ЕАЕ на введення антидепресантів (n=10)

Дослідні групи	М'язова сила ($M \pm m$)		
	Вихідний стан (BC)	12 доба	17 доба
ЕАЕ (активний контроль)	$12,0 \pm 2,2$	$4,5^* \pm 1,4$	$0,6^* \pm 0,7$
ЕАЕ + М	$9,5 \pm 1,25$	$1,9^* \pm 0,65$	$1,8^* \pm 0,23$
ЕАЕ + М + Амітриптилін	$10,6 \pm 1,5$	$3,4^* \pm 0,8$	$2,2^* \pm 0,7$
ЕАЕ + М + Флуоксетин	$13,6 \pm 1,71$	$2,9^* \pm 0,93$	$5,1 \pm 1,65$
ЕАЕ + М + Тразодон	$10,9 \pm 1,40$	$2,8^* \pm 0,56$	$4,6 \pm 1,37$
ЕАЕ + М + Пароксетин	$11,5 \pm 2,25$	$2,9^* \pm 0,90$	$5,0 \pm 0,75$

Примітка. * - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану.

Показано, що на фоні 5-денного введення метилпреднізолону однократне застосування амітриптиліну не викликало змін сили м'язів: так, тварини були практично неспроможними «зависнути» на стержні ($2,2 \pm 0,7$ с),

що у порівнянні з показниками вихідного стану складало лише 20,75% ($p \leq 0,5$).

Встановлено, що введення флуоксетину та пароксетину сприяло зміцненню м'язової сили: збільшення часу, протягом якого щури «висіли» на стержні, становило 78,4% ($p \leq 0,05$) та 74,21% ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками 12 доби експерименту (рис. 5.6). Крім того, статистично значиме посилення м'язової сили у порівнянні з показниками групи метилпреднізолону зареєстроване при введенні флуоксетину, тразодону та пароксетину: +189,3% ($p \leq 0,05$), +161,01% ($p \leq 0,05$) та + 182,5% ($p \leq 0,05$) відповідно при порівнянні показників у даний проміжок експерименту.

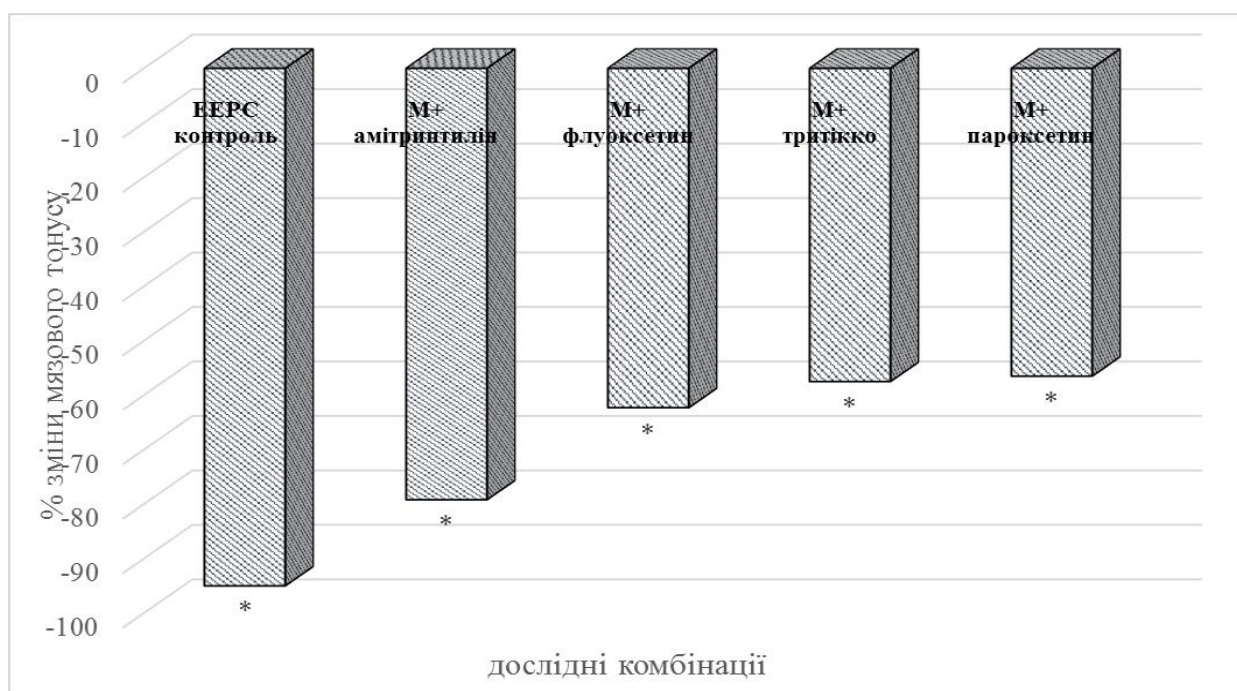


Рис. 5.6. Зміни м'язової сили на фоні комбінованого введення метилпреднізолону з антидепресантами за умов ЕАЕ

Отже, комбіноване введення метилпреднізолону з антидепресантами за умов модельованої патології не здатне повністю відновити м'язову силу, порушену індукцією ЕАЕ. При цьому застосування тразодону та пароксетину статистично значимо збільшує м'язову силу майже у 3 рази у порівнянні з показниками групи метилпреднізолону.

5.4. Вивчення антидепресивної активності дослідних комбінацій за умов ЕАЕ

Одним з клінічних проявів хронічного запального та демієлінізуючого процесу при РС є порушення вищих кіркових функцій, яким до недавнього часу приділялася недостатня увага при аналізі неврологічного статусу та оцінці ефективності лікування. При цьому більше половини хворих вже на початкових стадіях захворювання пред'являють скарги на стійкі порушення нейропсихічних функцій (біль, інсомнія) і практично всі в тій чи іншій мірі мають нейропсихічні розлади (зменшення м'язової сили, дезадаптація та депресія) [61]. Депресія - дуже частий супутник РС. Більше того, понад 50% пацієнтів з РС в різний період хвороби відчують настільки серйозні симптоми депресії, що потребують медикаментозної корекції [319].

Оцінкою антидепресивної активності дослідних засобів в тесті Порсолта нами встановлено, що в групі активного контролю час іммобілізації (завмирання тварин в воді при примусовому плаванні) був найвищим: $209,4 \pm 11,9$ сек (рис. 5.6), що відповідало високому рівню тривожності та занепокоєння. При використанні антидепресантів час іммобілізації зменшувався для групи амітриптиліну на 27,75% ($p \leq 0,05$), для флуоксетину на 33,43% ($p \leq 0,05$), для тразодону на 48,05% ($p \leq 0,05$) та для пароксетину на 46,7% ($p \leq 0,05$) (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Рівень тривожності щурів з ЕАЕ на фоні комбінованого введення метилпреднізолону з антидепресантами (n=10)

Дослідні комбінації	Доза, мг/кг	Час завмирання (іммобілізації)
ЕАЕ (активний контроль)	-	$209,4 \pm 11,9$
ЕАЕ + М	3,4	$185,0 \pm 11,2$
ЕАЕ + М + Амітриптилін	3,4+10	$151,2^* \pm 18,4$
ЕАЕ + М + Флуоксетин	3,4+25	$139,4^* \pm 5,6$
ЕАЕ + М + Тразодон	3,4+40	$112,5^* \pm 15,0$
ЕАЕ + М + Пароксетин	3,4+8	$108,7^* \pm 7,8$

Примітка.

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.

Порівняльним аналізом часу іммобілізації на фоні використанні антидепресантів з показниками групи метилпреднізолону встановлено, що для груп тразодону та пароксетину він був нижчим у 1,7 ($p \leq 0,05$) та у 1,6 ($p \leq 0,05$) відповідно (рис. 5.6).

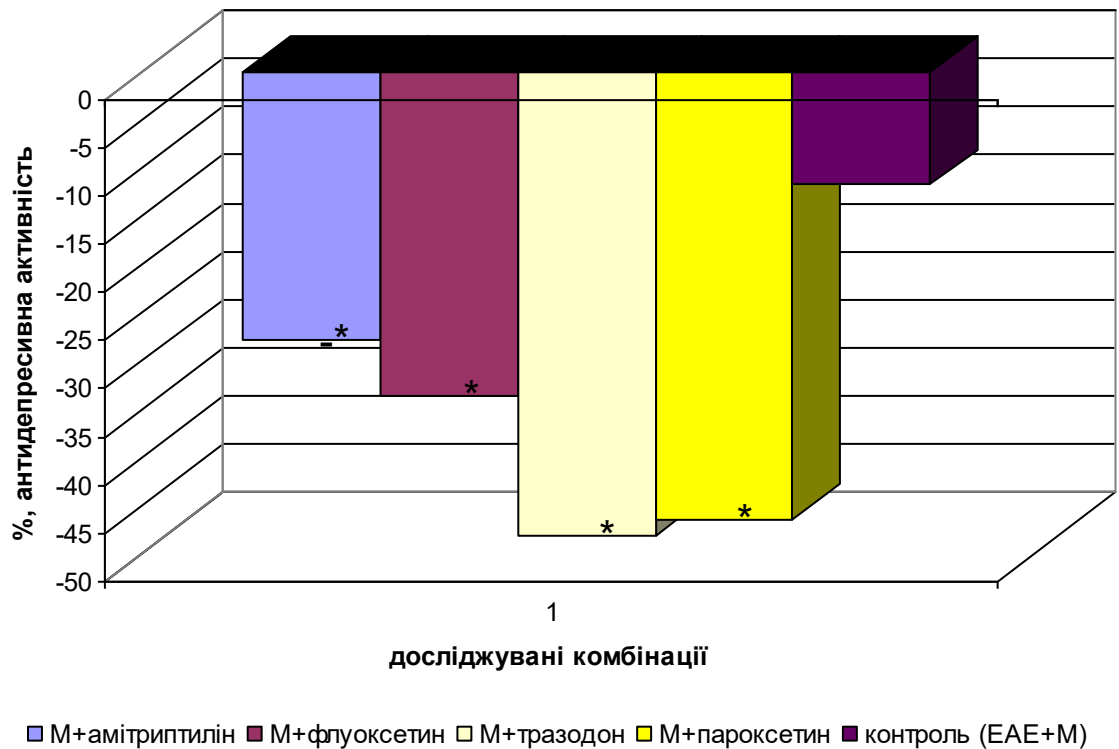


Рис. 5.6. Зміни часу іммобілізації у щурів з ЕАЕ при введенні антидепресантів на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном

Примітка. * - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників вихідного стану.

Отже, дослідні антидепресанти проявляють 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.

5.5. Дослідження здатності антидепресантів потенціювати медикаментозний сон за умов ЕАЕ на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном

У багатьох пацієнтів з РС спостерігається безсоння або переривчастий поверхневий сон, однак його порушення не є прямим наслідком хвороби. Зазвичай вони викликані вторинними факторами: стресом, спастичністю, обмеженою фізичною активністю або депресією. Тому метою чинного етапу дослідження була оцінка здатності антидепресантів потенціювати медикаментозний сон у щурів з ЕАЕ.

Оцінку ефективності антидепресантів в даній серії експериментальних досліджень проводили по двох показниках: часу засипання тварин (латентний період сну) та його тривалості у щурів з ЕАЕ. Медикаментозний сон викликали тіопенталом натрію (30 мг/кг). Результати експерименту представлені в табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Характеристика медикаментозного сну у щурів з ЕАЕ на фоні комбінованого введення метилпреднізолону з антидепресантами (n=10)

Дослідні комбінації	Доза, мг/кг	Час засинання (сек.)	Тривалість сну (хв.)
ЕАЕ (активний контроль)	-	61,8±13,1	28,1±3,6
ЕАЕ + М	3,4	55,6±12,0	35,1±3,3
ЕАЕ + М + Амітриптилін	3,4+10	29,2±5,6	51,1±5,4
ЕАЕ + М + Флуоксетин	3,4+25	24,3*±5,8	61,2*±7,8
ЕАЕ + М + Тразодон	3,4+40	29,7*±3,2	65,6*±8,3
ЕАЕ + М + Пароксетин	3,4+8	23,6*±4,2	54,4*±6,8

Примітка.

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.

Показано, що в групі активного контролю тривалість часу засинання складала 61,8±13,1 сек: тварини були занепокоєні, похитувалися з боку на

бік, поки приймали позу сну (на боці чи на животі). При цьому в групі тварин, яким вводили метилпреднізолон, щури також засинали занепокоєними, але швидше ($55,6 \pm 12,0$ сек) в порівнянні з активним контролем. Протилежна динаміка зареєстрована при оцінці тривалості сну: в групі I він був менш тривалим у порівнянні з групою II на 24, 9% ($p \geq 0,05$).

Встановлено, що при застосуванні антидепресантів спостерігалась однонаправлена динаміка змін латентного періоду та тривалості сну (рис. 5.7). Так, на фоні введення амітриптиліну та пароксетину сон у щурів з ЕАЕ був тривалішим на 81,85% ($p \leq 0,05$) та 93,59% ($p \leq 0,05$) відповідно у порівнянні з групою контролю. При використанні флуоксетину та тразодону даний показник змінювався ще більше – зростав у 1,74 ($p \leq 0,05$) та у 1,86 ($p \leq 0,05$) рази відповідно у порівнянні з показниками групи метилпреднізолону.

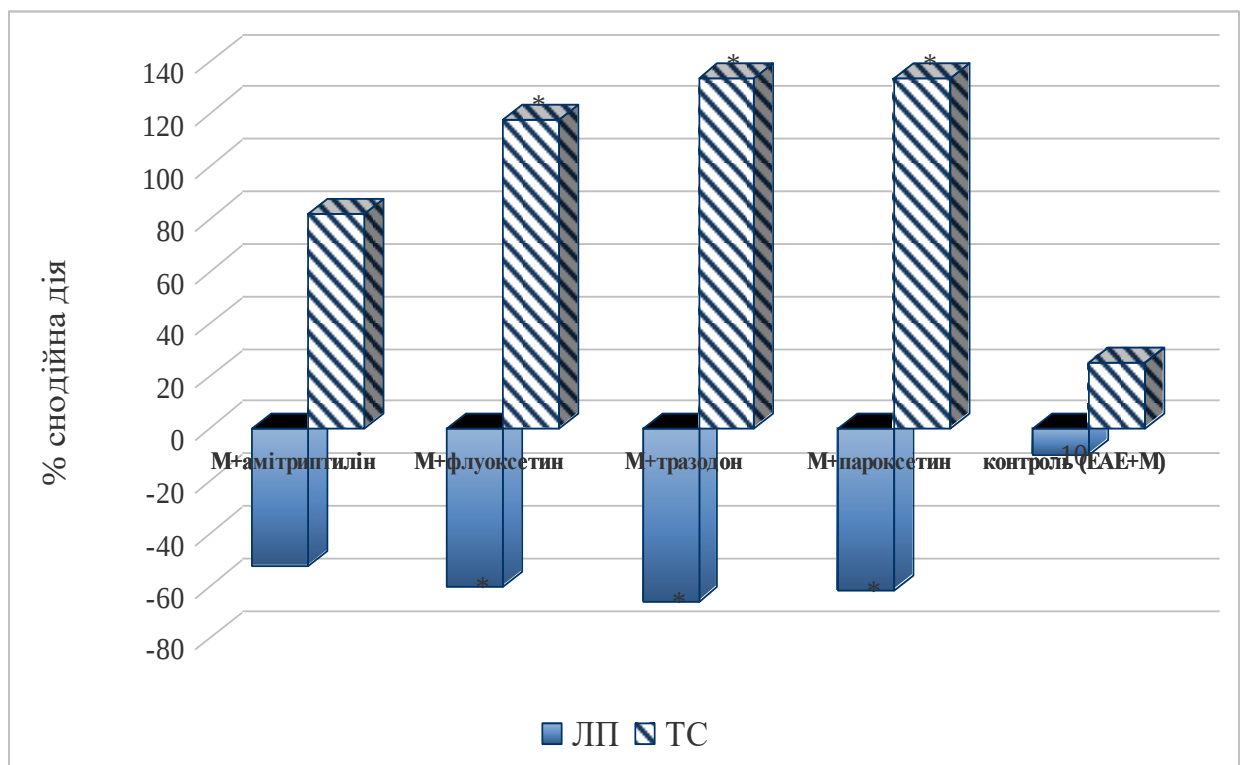


Рис. 5.7. Характеристика медикаментозного сну у щурів з ЕАЕ на фоні комбінованого введення метилпреднізолону з антидепресантами

Примітка.

* - $p \leq 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.

Отже, за результатами аналізу впливу на час засинання та тривалість тіопенталового сну дослідні антидепресанти можна розташувати у наступному порядку: М + Тразодон (-66,5% та +133,45%) $\geq$ М + Флуоксетин (-60,5% та + 117,79%) $\geq$ М + Пароксетин (-61,8% та + 93,59%) $\geq$ М + Амітриптилін (-52,75% та +81,85%).

5.6. Аналіз впливу антидепресантів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі базової терапії метилпреднізолоном

Найчисленнішу групу при розсіяному склерозі складають болі невропатичного характеру. Їх розвиток зумовлений осередками демієлінізації в нервовій системі, що призводить до змін функціонування іонних каналів у пошкоджених аксонах та формування ектопічних вогнищ генерації нервових імпульсів. Невропатичні болі при розсіяному склерозі можуть проявлятися печінням, дизестезіями, поколюванням або відчуттям болю у відповідь на не больовий стимул [5].

Найчастіше при розсіяному склерозі зустрічаються дизестезії. Дизестезичні болі зазвичай спостерігаються у пацієнтів з переважним залученням малих С-волокон (викликають розлади поверхневої больової і температурної чутливості і вегетативну дисфункцію). Дещо рідше, при тунельних невропатіях, зустрічається тронкальний біль, обумовлений, імовірно, дисфункцією A_δ-волокон [20].

Для терапії невропатичного больового синдрому при розсіяному склерозі застосовують амітриптилін, ламотриджин, карбамазепін, габапентин, топірамат, хоча широкомасштабних доказових досліджень ефективності цих препаратів не проводили [67, 117].

Враховуючи вище зазначене, ми вважали доцільним проведення порівняльного фармакологічного аналізу впливу амітриптиліну, флуоксетину, пароксетину та тразодону (третіко) на прояви невропатичного больового синдрому за умов експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) - експериментального еквіваленту РС.

Оцінку ефективності впливу досліджуваних препаратів на нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію, індуковану експериментальним алергічним енцефаломієлітом, проводили на білих безпорідних щурах, які були розподілені на 6 груп: I – інтактні тварини (пасивний контроль), $n=12$; II – щури з ЕАЕ (активний контроль), $n=12$; III – ЕАЕ + метилпреднізолон (М) + амітриптилін (10 мг/кг), $n=12$; IV – ЕАЕ + М + пароксетин (8 мг/кг), $n=12$; V – ЕАЕ + М + флуоксетин (25 мг/кг), $n=12$; VI – ЕАЕ + М + тразодон (40 мг/кг), $n=12$.

Для цього в кожній групі експериментальних тварин з ЕАЕ реєстрували пороги тактильної та больової чутливості. Тактильну алодинію у тварин вивчали в модифікації філаментного тесту von Frey шляхом реєстрацією тиску, при якому тварини відсмикували ліву задню лапу, уникаючи впливу наростаючих по силі стимулів. Оцінку впливу препаратів на прояви хімічної гіпералгезії проводили з використанням формалінового тесту, термічної гіпералгезії - в тесті «гаряча пластина» (опис методик детально представлений в розділі 2).

Для визначення впливу препаратів на нейрональну сенситизацію, алодинію і гіпералгезію тваринам протягом тижня вводили солу-медрол згідно клінічному алгоритму застосування препарату. Крім того, з метою визначення фармакологічної активності антидепресантів їх застосовували додатково внутрішньошлунково один раз на добу з другого по 16-й день

після індукції ЕАЕ (латентна фаза + клінічна фаза до закінчення піку захворювання).

Показано, що підшкірна інокуляція енцефалітогенної суміші викликала розвиток нейрональної сенситизації, алодинії і гіпералгезії (рис. 5.8).



Рис. 5.8. Характеристика проявів невропатичного больового синдрому за умов ЕАЕ у щурів

Примітки:

- * - $p < 0,001$ по відношенню до показників інтактного контролю;
- ** - $p < 0,05$ по відношенню до показників інтактного контролю.

Зокрема, у тварин експериментальних груп після індукції ЕАЕ реєструвалося статистично значиме зниження порогу тактильної чутливості в 2,3 рази ($p < 0,001$) по відношенню до інтактного контролю. При цьому ін'єкція 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи щурів призводило до статистично значимого збільшення загальної кількості здригувань в 9,5 рази ($p < 0,001$) по відношенню до групи інтактних тварин. До того ж, у тесті «гаряча пластина» у щурів з ЕАЕ-індукованої невропатією латентний період

реакції уникнення статистично значимо знижувався в 1,7 рази ($p < 0,05$) по відношенню до групи інтактного контролю (рис. 5.8).

Результати оцінки змін алодинії та гіпералгезії після курсового застосування антидепресантів за умов ЕАЕ-індукованої невропатії представлені в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

Зміни тактильної чутливості, хімічної та термічної гіпералгезії у щурів після курсового комбінованого введення метилпреднізолону з антидепресантами за умов ЕАЕ

<i>Групи тварин</i>	<i>Тактильна алодинія, поріг відсмикування, г</i>	<i>Формаліновий тест, загальна кількість здригувань</i>	<i>Тест «hot plate», латентний період уникнення, сек</i>
Інтактний контроль (n = 12)	$12,9 \pm 1,40$	$7,3 \pm 0,56$	$10,5 \pm 0,99$
Активний контроль (n = 12)	$5,7^* \pm 0,66$	$69,6^* \pm 6,53$	$5,9^{**} \pm 0,77$
Амітриптилін, 10 мг/кг (n = 12)	$9,1^{\square} \pm 1,30$	$41,3^{\square} \pm 4,72$	$8,8^{\square} \pm 0,83$
Пароксетин, 8 мг/кг (n = 12)	$6,5 \pm 0,63$	$66,0 \pm 4,49$	$7,2 \pm 0,75$
Флуоксетин, 25 мг/кг (n = 12)	$6,7 \pm 0,86$	$61,7 \pm 4,80$	$7,7 \pm 0,76$
Тразодон, 40 мг/кг (n = 12)	$8,0^{\square} \pm 0,50$	$55,2 \pm 6,79$	$8,0 \pm 0,82$

Примітки:

* - $p < 0,001$ по відношенню до показників інтактного контролю;

** - $p < 0,05$ по відношенню до показників інтактного контролю;

$\square$ - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.

Встановлено, що при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки після курсового введення антидепресантів статистично значиме підвищення порогу алодинії по відношенню до показників активного контролю реєструвалося тільки у тварин II і V експериментальних груп.

Зокрема, 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%, $p > 0,05$) (табл. 5.7).

На думку Барінова Н.А. (2007), механізми, пов'язані з порушенням процесів гальмування на рівні заднього рогу, беруть участь у розвитку стимулзалежного болю, що виникає у відповідь на подразнення сенсibiliзованих в результаті пошкодження периферичних ноцицепторів [117]. Внаслідок збільшення збудливості чутливих нейронів задніх рогів спинного мозку, пов'язаних із зоною іннервації пошкодженого нерва, відбувається сенсibiliзація прилеглих інтактних нейронів з розширенням рецептивної зони [117]. Сенсibiliзація нейронів задніх рогів приводить до зниження больового порогу і розвитку алодинії, тобто появи больових відчуттів на подразнення, яке в нормі ними не супроводжується [117].

Показано, що після курсового введення антидепресантів загальна кількість здригувань, що викликаються ін'єкцією 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи експериментальних щурів, було меншим, ніж у групі контролю. Так, 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 (табл. 5.7).

До того ж, за умов курсового введення амітриптиліну, флуоксетину, пароксетину та тразодону статистично значиме збільшення латентного періоду реакції облизування лапок на 49% ($p < 0,05$) по відношенню до показників контролю також реєструвалося тільки після застосування амітриптиліну (табл. 5.7).

Згідно з даними Барінова Н.А. (2007), специфічні теплові TRPV-3 і TRPV-4 терморецептори A_{δ} -афферентів (проводять невольову імпульсацію)

активуються в нормі при більш низькій температурі, ніж TRPV-1 і TRPV-2 рецептори С-аферентів (проводять больову імпульсацію), і пригнічують проведення ноцицептивної аферентації на центральному рівні. Пошкодження A_{δ} -афферентів при невропатії приводить до втрати гальмівних впливів на спинальному рівні та зміні теплового больового порогу. Таким чином, біль виникає у зв'язку з подразненням TRPV-1 рецепторів при більш низькій, ніж в нормі, температурі внаслідок порушення центрального гальмування [117]. Можливо, тільки курсове введення амітриптиліну сприяло відновленню структурної організації мієлінізованих A_{δ} -афферентів, пов'язаних з ваніллоїдними терморецепторами TRPV-4 і TRPV-3, нормалізуючи гальмівні впливу на спинальному рівні і викликаючи центральну модифікацію полімодального сенсорного імпульсу.

Отже, курсове застосування амітриптиліну і тразодону, але не пароксетину або флуоксетину послаблює індуковані експериментальним алергічним енцефаломієлітом нейрональну сенситизацію, алодинію та гіпералгезію.

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 [117]: 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 [110, 117, 157].

Вважається, що антиноцицептивні властивості антидепресантів більш виражені у препаратів, що впливають на як серотонінергічну, так і норадренергічну нейромедіаторні системи [117], що підтверджують результати нашого дослідження.

5.7. Резюме

Аналіз отриманих результатів, описаних у цьому розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Інокуляція енцефалітогенної суміші на 9 - 11 добу викликає розвиток ЕАЕ, який сприяє розвитку порушень орієнтовно-дослідницької активності, нейрональної сенситизації, алодинії та гіпералгезії, а також зниженню м'язової сили у експериментальних тварин.

2. На фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу максимально виражену знеболюючу активність виявляють флуоксетин та тразодон.

3. За умов ЕАЕ антидепресанти не здатні повністю усувати дефіцит рухової активності, але нормалізують дослідницьку діяльність та практично повністю відновлюють показники емоційної активності. При цьому найбільш виражений вплив щодо нормалізації поведінкових реакцій, порушених індукцією ЕАЕ, спостерігається на фоні введення тразодону та пароксетину.

4. Досліджені антидепресанти зберігають достатній рівень протитривожної та антидепресивної дії у щурів з модельованим експериментальним алергічним енцефаломієлітом на тлі фармакотерапії метилпреднізолоном.

5. За здатністю потенціювати час засинання та тривалість медикаментозного сну тест-зразки можна розташувати у наступному порядку: тразодон > флуоксетин > пароксетин > амітриптилін.

6. Курсове застосування амітриптиліну і тразодону, але не пароксетину або флуоксетину за умов ЕАЕ викликає нормалізацію тактильної і больової чутливості різного ступеню вираженості.

7. Здатність послаблювати прояви невропатичного больового синдрому за умов експериментального алергічного енцефаломієліту зменшується в ряду амітриптилін > тразодон >> флуоксетин $\approx$ пароксетин.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗАСОБІВ НЕЙРОПРОТЕКТИВНО-АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСУ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ

За свідченням ряду авторів [19, 60, 69, 85], перебіг множинного (розсіяного) склерозу досить часто супроводжується розвитком «окислювального стресу» з деструкцією білків на тлі зниження відновленого глутатіону. Активність захворювання статистично значимо корелює з показниками рівня перекисного окислення ліпідів сироватки крові та супроводжується низькими показниками антиоксидантного захисту. При цьому дегенерація аксонів, обумовлена шкідливою дією вільних радикалів, домінує над запаленням і демієлінізацією.

Очевидно, що розв'язання проблеми ефективного лікування таких пацієнтів може одержати свій розвиток при застосуванні адекватної нейропротективної та антиоксидантної терапії, який «розшиватиме» найбільш «вузькі місця» нейропротективного та антиоксидантного захисту. З урахуванням зазначених особливостей патогенезу захворювання, натеper перспективним напрямом терапії розсіяного склерозу все частіше розглядається нейропротекція, яка визначається як захист нейронів і глії від ушкодження, яке викликається екзо- або ендогенними шкідливими агентами чи процесами [21]. 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 [70, 163]. Враховуючи сучасні

стандарти нейропротекції при розсіяному склерозі, а також фармако-економічні показники (співвідношення вартість/ефективність), натеper оптимальну нейропротективну терапію захворювання з позицій практичної неврології проводять із залученням засобів протизапальної терапії, препаратів протидії апоптозу нейронів та олігодендроцитів, засобів гальмування глутаматної ексайтотоксичності, антиоксидантної та ремієлінізуючої терапії [163].

В даному розділі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльну характеристику 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.

6.1. Дослідження впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на латентний період ЕАЕ, його тривалість та тяжкість неврологічних розладів

Оцінку ефективності нейропротективної дії досліджуваних препаратів проводили на моделі експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) на білих безпорідних щурах, які та були розподілені на 6 груп: I – інтактні тварини (пасивний контроль), n=10; II – щури з ЕАЕ (активний контроль), n=12; III – ЕАЕ + метилпреднізолон (М: 3,4 мг/кг), n=10; IV – ЕАЕ + М + нейровітан (25 мг/кг в перерахунку на октотіамін), n=10; V – ЕАЕ + М + цитиколін (500 мг/кг), n=10; VI – ЕАЕ + М + α -ліпоева кислота (25 мг/кг), n=10.

Для цього в кожній групі експериментальних тварин з ЕАЕ розраховували: 1) тривалість латентного періоду ЕАЕ; 2) загальну кількість щурів з помірним і важким перебігом експериментального алергічного енцефаломієліту (у відсотках від кількості в групі); 3) середній клінічний

індекс на піку ЕАЕ; 4) середній кумулятивний індекс «хвороби»; 5) середню тривалість «захворювання».

Тяжкість неврологічних порушень оцінювали в балах за клінічним індексом. Клінічний індекс (*КлінІ*) визначали за шкалою: м'язова слабкість однієї кінцівки - $\frac{1}{2}$ бала, парез - 1 бал, параліч - $1\frac{1}{2}$ бала. При залученні в процес декількох кінцівок бали підсумовували. Відсутність порушень приймали за 0 балів, летальний результат - 6 балів. Тварин з клінічним індексом $\frac{1}{2}$ - $2\frac{1}{2}$ балів відносили в групу з легкою формою експериментального еквівалента розсіяного склерозу; 3 - 6 балів відповідало важкому перебігу ЕАЕ. Для інтегративної оцінки тяжкості ЕАЕ для кожної тварини розраховували кумулятивний індекс (*КумулІ*) - суму індивідуальних клінічних індексів за період «хвороби» [183].

Для визначення впливу препаратів на латентний період ЕАЕ, його тривалість та тяжкість неврологічних розладів тваринам протягом тижня вводили метилпреднізолон згідно клінічному алгоритму застосування препарату. Крім того, з метою визначення фармакологічної активності засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу, їх застосовували додатково внутрішньошлунково один раз на добу з другого по 16-й день після індукції ЕАЕ (латентна фаза + клінічна фаза до закінчення піку захворювання).

Результати проведених досліджень (табл. 6.1) свідчать, що за умов одноразової підшкірної інокуляції енцефалітогенної суміші в повному ад'юванті Фрейнда у тварин контрольної групи реєструвався розвиток неврологічних порушень різного ступеня тяжкості; летальний результат захворювання спостерігався у одного з 12 гризунів (8,3%). В області інокуляції були відзначені прояви запалення, які зберігалися більше 20 діб.

Показано, що після індукції ЕАЕ у щурів групи контролю перші неврологічні розлади були зафіксовані на 9 - 11 добу. Пік клінічних проявів експериментального алергічного енцефаломієліту у більшості тварин розвивався на 12 - 14 добу і тривав в середньому 4 дні; при цьому тривалість

ЕАЕ склала $16,4 + 1,8$ днів при середньому кумулятивному індексі 27,2 балів. При цьому на піку клінічних проявів ЕАЕ кількість тварин з клінічним індексом $\frac{1}{2} - 2\frac{1}{2}$ балів склала 41,7% щурів, що відповідало легкому ступеню «захворювання», а важкий перебіг ЕАЕ спостерігалось у 58,3% гризунів (клінічний індекс 3 - 6 балів).

Встановлено, що введення метилпреднізолону (3,4 мг/кг у вену крапельно протягом тижня) усувало летальні випадки, повністю попереджало розвиток неврологічних розладів у 20% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ до 30%. При цьому перші неврологічні симптоми ЕАЕ були зареєстровані в середньому через 16,8 днів, протікали короткочасно (тривалість ЕАЕ вкорочувалася в 2 рази, $p < 0,05$) і в легкій або середньотяжкій формі (клінічний індекс на піку захворювання зменшувався в 1,5 рази ($p < 0,05$), кумулятивний - практично в 3 рази ($p < 0,05$) (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Оцінка впливу нейровітану (Н), цитиколіну (Ц) и α -ліпоєвої кислоти (АЛК) на перебіг ЕАЕ в за умов базової терапії метилпреднізолоном (М)

Показники	Групи тварин				
	Контроль, ЕАЕ (n=12)	М (n=10)	Н + М (n=10)	Ц + М (n=10)	АЛК + М (n=10)
% тварин, що «захворіли» (всього/ тяжко)	91,7/58,3	80/30	75/25	62,5/12,5	75/25
Латентний період ЕАЕ, дні (тест Стьюдента)	$10,6 \pm 1,2$	$16,8^* \pm 1,8$	$17,6 \pm 2,1$	$19,4 \pm 2,1$	$18,2 \pm 1,9$
Середній Кліні на піку ЕАЕ, бали (тест Манна- Уїтні)	2,4	1,6*	1,5	1•	1,3
Середній КумулІ, бали (тест Манна- Уїтні)	27,2	9,4*	8,8	6,6	7,8
Тривалість ЕАЕ, дні (тест Стьюдента)	$16,4 \pm 1,8$	$8,4^* \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,7$	$5,0^* \pm 0,4$	$6,3 \pm 0,6$

Примітки: * - $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з контролем);
• - $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з групою М).

Слід зазначити, що курсове застосування нейровітану (25 мг/кг в перерахунку на октотіамін) з другого по 16 день після інокуляції енцефалітогенної суміші на тлі терапії метилпреднізолоном попереджало розвиток ЕАЕ лише у 25% тварин з легким перебігом захворювання, істотно не змінюючи тривалість латентного періоду ЕАЕ в порівнянні з групою М. До того ж, нейровітан в середньому тільки в 1,1 - 1,2 рази зменшував клінічний індекс на піку патології, а також кумулятивний індекс і тривалість захворювання в порівнянні з групою, що одержувала базову гормональну терапію (табл. 6.1, рис. 6.1).

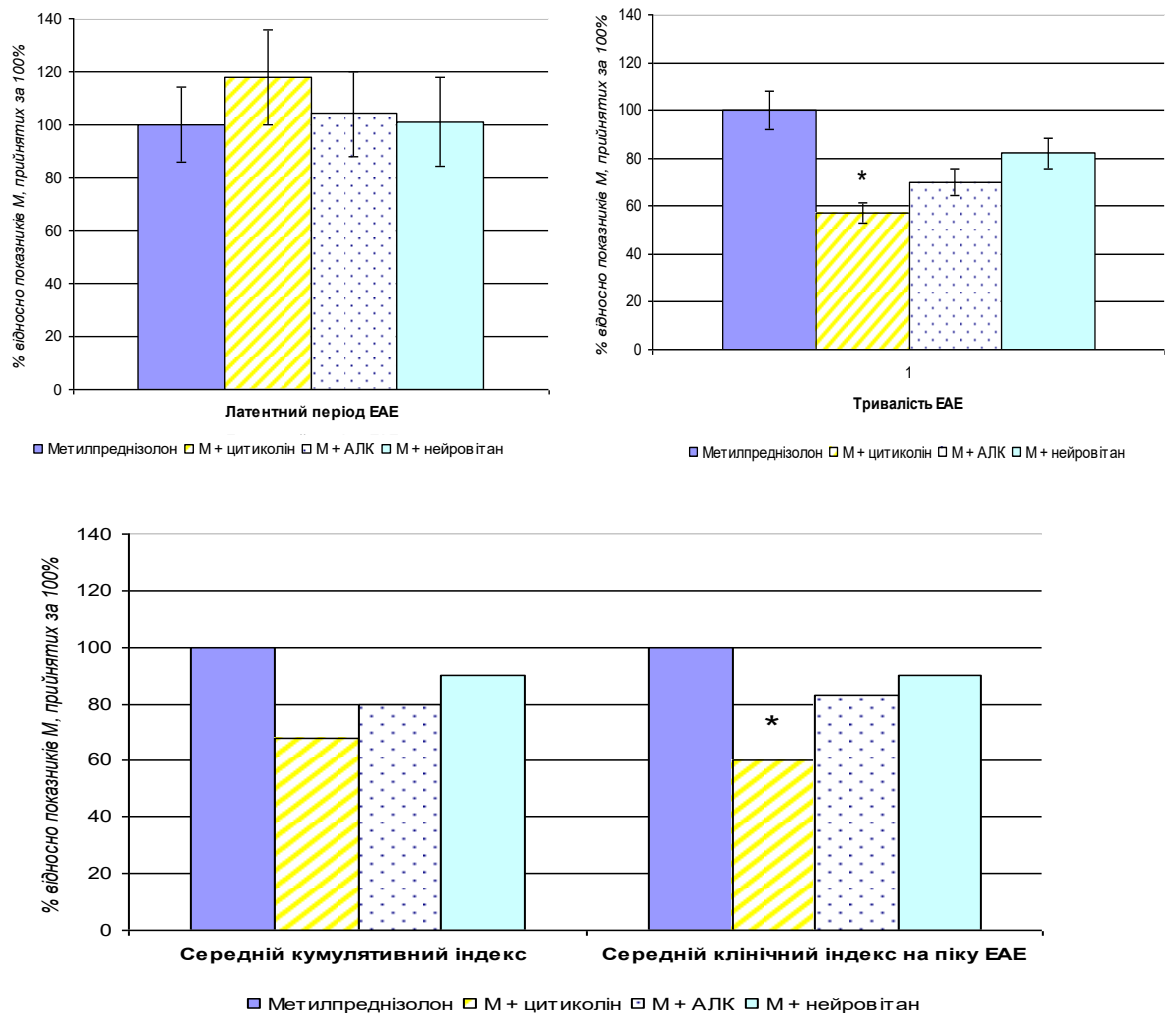


Рис. 6.1. Вплив курсового введення нейровітану, цитиколіну і α -ліпоєвої кислоти на показники ЕАЕ за умов базової терапії метилпреднізолоном (М)

Примітка. * - $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з групою М).

Очевидно, терапевтичний ефект нейровітану щодо проявів експериментального алергічного енцефаломієліту за умов базової терапії метилпреднізолоном опосередковується комплексом вітамінів групи «В» у високому дозуванні, що входять до його складу. Це забезпечувало розвиток нейропротективних, антиоксидантних і трофічних ефектів, які сприяли ремієлінізації. Властивість даної комбінації заснована на фармакологічних ефектах, характерних для високих доз цих вітамінів, і не залежить від їх дефіциту. Ймовірно, октотіамін шляхом посилення енергозабезпечення у формі АТФ підтримував аксоплазматичний транспорт, тоді як піридоксин брав участь у синтезі транспортних білків, а цианокобаламін забезпечував доставку жирних кислот для клітинних мембран і мієлінової оболонки [97].

Встановлено, що одночасне застосування антиоксиданту α -ліпоєвої кислоти (50 мг/кг) і метилпреднізолону повністю запобігало розвитку ЕАЕ у 25% тварин. У решти гризунів введення препарату на тлі базової гормональної терапії помірно послаблювало тяжкість і тривалість ЕАЕ. Зокрема, клінічний індекс на піку патології зменшувався на 19%, кумулятивний - на 17%, а тривалість ЕАЕ - в 1,3 рази в порівнянні з групою, що одержувала метилпреднізолон (табл. 6.1, рис. 6.1).

Ймовірно, терапевтична дія α -ліпоєвої кислоти при ЕАЕ реалізувалася за рахунок її антиоксидантних властивостей, що пов'язано з наявністю в структурі препарату тіолових груп. Крім того, α -ліпоат, можливо, гальмував експресію адгезивних молекул, синтез прозапальних цитокінів, збільшував внутрішньоклітинний пул глутатіону та виявляв антирадикальну дію [118].

Зазначено, що застосування цитиколіну (500 мг/кг) з другого по 16 день після інокуляції ЕГС на тлі терапії метилпреднізолоном попереджало розвиток ЕАЕ у 37,5% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ до одного з восьми (12,5 %).

У порівнянні з моновведенням глюкокортикоїду, поєднане застосування цитиколіну і метилпреднізолону сильніше зменшувало вираженість неврологічних порушень. Зокрема, в даній серії досліджень на 38%

знижувався клінічний індекс на піку ЕАЕ, на 30% - кумулятивний індекс захворювання, а також вкорочувалася тривалість ЕАЕ з 8,4 до 5 днів у порівнянні з групою, що одержувала базову гормональну терапію (табл. 6.1, рис. 6.1).

Можливо, екзогенний цитиколін, будучи нейропротекторним засобом, бере участь у біосинтезі мембранних фосфоліпідів нейронів, в першу чергу, фосфатидилхоліну (лецитину). Фосфоліпіди формують структурно-функціональну основу нейрональних мембран, які забезпечують діяльність нервових клітин і мозку в цілому (підтримання іонного балансу і активності мембранних ферментів, забезпечення проведення нервового імпульсу тощо). Цитиколін при екзогенному введенні швидко гідролізується в організмі на циркулюючі цитидин і холін, з яких після всмоктування в системний кровотік ресинтезується ЦДФ-холін. Основним механізмом дії цитиколіну, що визначає його нейропротекторні властивості, є забезпечення збереження зовнішніх і внутрішніх (цитоплазматичних та мітохондріальних) нейрональних мембран, насамперед, шляхом ослаблення активності фосфоліпази A_2 , активації нейрональних мітохондріальних цитохромоксидаз та інгібування глутамат-індукованого апоптозу [118].

Отже, інокуляція енцефалітогенної суміші на 9 - 11 добу у 91,7% тварин викликає розвиток ЕАЕ, який характеризується важким і тривалим перебігом. Отримані результати свідчать і про те, 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 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 еквіваленту розсіяного склерозу у тварин. Помірна вираженість терапевтичного ефекту α -ліпоевої кислоти і нейровітану в наших

умовах експерименту вказує, очевидно, на необхідність проведення більш тривалого курсу застосування цих компонентів антиоксидантної і ремієлінізуючої терапії [115, 131, 168, 295].

6.2. Оцінка впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на процеси навчання та консолідації енграм пам'яті за умов ЕАЕ

Феноменологія розладів вищих психічних функцій при розсіяному склерозі стала предметом низки досліджень, проведених за останні роки. Так, за даними ряду авторів, поширеність когнітивних порушень у хворих на РС становить від 20 до 95%. При цьому вираженість порушень у когнітивній сфері дуже різна – від повного збереження до важких розладів вже на ранніх стадіях хвороби [14, 84].

Сучасні напрямки корекції психопатологічних розладів, поряд з традиційними методами лікування, включають нейропротекторну терапію. Остання спрямована на уповільнення розвитку демієлінізації і нейродегенерації шляхом запобігання надлишкового утворення вільних радикалів, відновлення пошкоджених мембран клітин, впливу на механізми апоптозу тощо [163].

Вивчення ноотропних властивостей досліджуваних засобів проводили в тесті умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) на білих безпорідних щурах, розподілених на 6 груп: I – інтактні тварини (пасивний контроль), n=10; II – щури з ЕАЕ (активний контроль), n=10; III – ЕАЕ + метил преднізолон (М) + цитиколін (500 мг/кг), n=10; IV – ЕАЕ + М + α -ліпоева кислота (50 мг/кг), n=10; V – ЕАЕ + М + ніцерголін (10 мг/кг), n=10; VI – ЕАЕ + М + донепезил (10 мг/кг), n=10.

Для аналізу їх впливу на процеси вводу інформації засоби застосовували з другої по 10-у добу після індукції ЕАЕ (латентна фаза). З метою визначення фармакологічного впливу на процеси збереження умовної навички,

використовували подальше введення препаратів протягом 20 діб (середня тривалість ЕАЕ). Оцінку ефективності відтворення навику УРПУ при використанні досліджуваних препаратів проводили, визначаючи коефіцієнт антиамнестичної активності (K_{Aa}) за формулою:

$$K_{Aa} = (\Delta ЛП_{\text{препарат}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) / (\Delta ЛП_{\text{інтактні}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) \cdot 100\%,$$

де $\Delta ЛП = ЛП_{\text{тестування}} - ЛП_{\text{вироблення рефлексу}}$

Результати проведених досліджень свідчать, що на 10 добу введення препаратів після одноразової підшкірної інюкуляції енцефалітогенної суміші латентний період ($ЛП_1$) заходу тварин в темний відсік камери (до початку формування УРПУ) суттєво не відрізнявся у всіх групах (табл. 6.2).

Показано, що в групі пасивного контролю (інтактні тварини) на 12 добу дослідження реєструвалося збільшення латентного періоду $ЛП_2$. Так, тривалість прихованого часу УРПУ достовірно значимо, у 8 разів ($p < 0,05$) перевищувала показники вихідного фону, що свідчило про ефективність навчання в цій групі.

Таблиця 6.2

Вплив досліджуваних препаратів на процеси навчання та консолідації енграм пам'яті в тесті УРПУ за умов ЕАЕ, $M \pm m$

Групи тварин	Латентний період, сек		
	10 доба, $ЛП_1$	12 доба, $ЛП_2$	20 доба, $ЛП_3$
Пасивний контроль (інтактні), $n=10$	$20,2 \pm 2,23$	$168,7 \pm 9,23$	$145,2 \pm 14,22$
Активний контроль (ЕАЕ), $n=10$	$18,2 \pm 1,72$	$104,2^* \pm 13,15$	$84,8^* \pm 12,48$
ЕАЕ + М + цитиколін, 500 мг/кг ($n=10$)	$16,6 \pm 1,73$	$155,3^\bullet \pm 16,39$	$138,5^\bullet \pm 15,73$
ЕАЕ + М + α -ліпоєва кислота, 50 мг/кг ($n=10$)	$15,8 \pm 1,97$	$148,6^\bullet \pm 15,33$	$129,8^\bullet \pm 15,33$
ЕАЕ + М + ніцерголін, 10 мг/кг ($n=10$)	$19,8 \pm 1,44$	$145,3^\bullet \pm 13,91$	$131,0^\bullet \pm 14,59$
ЕАЕ + М + донепезил, 10 мг/кг ($n=10$)	$17,1 \pm 1,63$	$139,6 \pm 15,43$	$114,6 \pm 14,72$

Примітки:

- * – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з пасивним контролем);
- – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з активним контролем).

При цьому у гризунів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (активний контроль) показник ЛП₂ був на 38% ($p < 0,05$) достовірно значимо коротшим порівняно з групою контролю, а кількість тварин без сформованого рефлексу уникнення становила 80% (табл. 6.3) у відповідний період спостереження.

Таблиця 6.3

Вплив досліджуваних засобів на просторовий розподіл тварин
в тесті УРПУ за умов ЕАЕ

Групи тварин	Термін тестування, доба	«Небезпечний» відсік	Стартовий відсік	«Безпечний» » відсік	К _{ПБВ}
Пасивний контроль (інтактні), n=10	12	1	8	1	1
	20	1	6	3	3
Активний контроль (ЕАЕ), n=10	12	4	2*	4	1
	20	5	1*	4	0,6*
ЕАЕ + М + цитиколін, 500 мг/кг (n=10)	12	1	6•	1	1
	20	1	4	3	3•
ЕАЕ + М + α -ліпоєва кислота, 50 мг/кг (n=10)	12	1	5•	2	1
	20	2	3	3	1,5
ЕАЕ + М + ніцерголін, 10 мг/кг (n=10)	12	2	4	2	1
	20	2	3	3	1,5
ЕАЕ + М + донепезил, 10 мг/кг (n=10)	12	2	4	2	1
	20	3	2	3	1

Примітки:

- * – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з пасивним контролем);
- – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з активним контролем).

Тестування збереження енграм пам'яті у інтактних тварин на 20 день від початку проведення експериментальної терапії свідчило про помірне природне згасання умовного рефлексу в порівнянні з 12 добою дослідження. Зокрема, реєструвалося зменшення ЛП₃ на 21% ($p > 0,05$) по відношенню до ЛП₂, а частина тварин з втраченим навиком склала 40% (табл. 6.2 і 6.3). Однонаправлені зміни латентного періоду УРПУ зафіксовані і в групі

активного контролю (табл. 6.2 і 6.3). При відстроченому тестуванні ЛП₃ у гризунів з ЕАЕ показник був практично в 2 рази ($p < 0,05$) меншим, ніж у групі пасивного контролю, а кількість тварин з втраченим рефлексом досягла 90% (рис. 6.2).

Встановлено, що ослаблення процесів навчання та консолідації мнестического сліду у щурів з ЕАЕ супроводжувалося також дефіцитом просторової пам'яті. В основному, це спостерігалось в кінці експерименту, коли кількість тварин, що залишалися в стартовому (центральному) відсіку зменшилася в 3 рази, а показник $K_{ПБВ}$ знижувався в 5 разів ($p < 0,05$) в порівнянні з групою пасивного контролю (табл. 6.3).

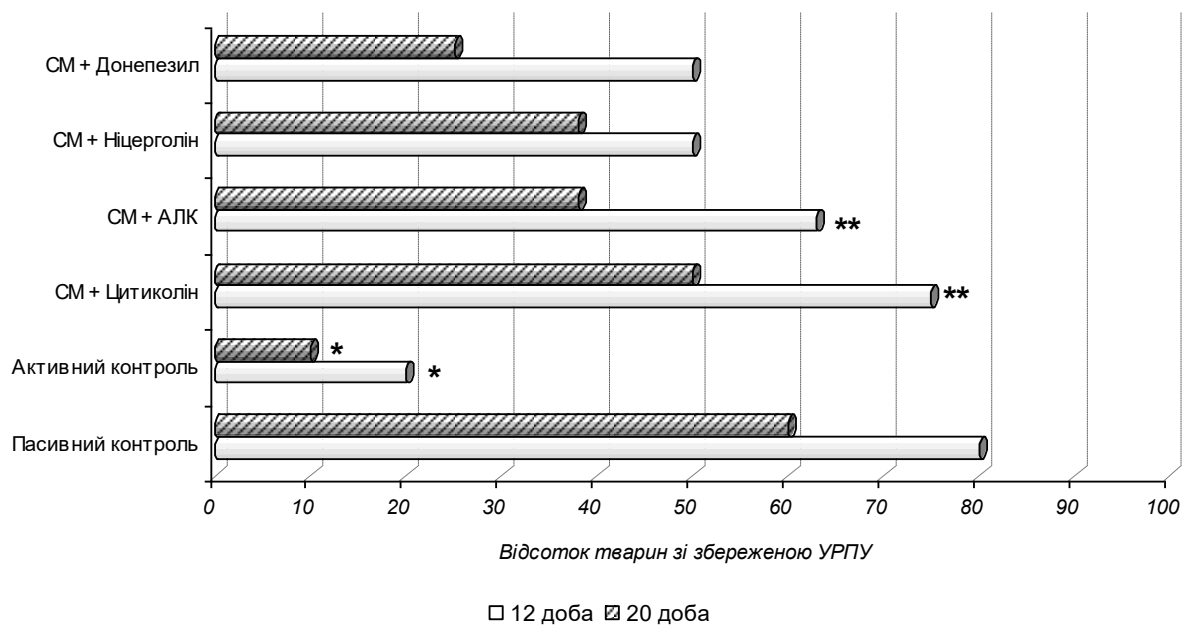


Рис. 6.2. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на розподіл тварин зі збереженою навичкою УРПУ за умов ЕАЕ

Примітки:

- * – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з пасивним контролем);
- ** – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з активним контролем).

Показано, що курсове застосування засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу у щурів з ЕАЕ сприяло достовірно значимому збільшення часу пасивно-оборонного рефлексу на 12 і 20 добу дослідження (табл. 6.2). 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 (табл. 6.2-6.3, рис. 6.2).

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 (табл. 6.2 і 6.3). Антиамнестична активність препарату характеризувалася зростанням показника $K_{\Delta a}$, який становив 84% і 95% відповідно на 12 і 20 добу експерименту (рис. 6.3).

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 $K_{\text{ПБВ}}$ у тварин з втраченою навичкою в умовах експериментальної демієлінізуючої патології ЦНС достовірно збільшувалося в 5 разів ($p < 0,05$) (табл. 6.3).

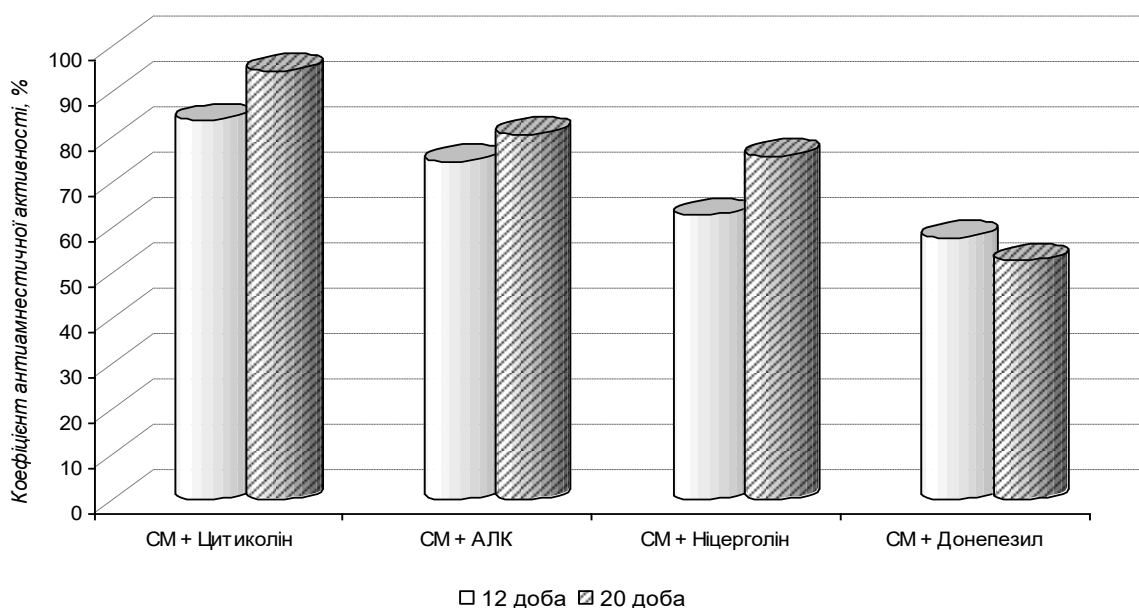


Рис. 6.3. Оцінка антиамнестичної активності засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу у щурів за умов ЕАЕ

Застосування α -ліпоевої кислоти (АЛК, 50 мг/кг) характеризувалося зростанням значень ЛП₂ і ЛП₃ на 43% ($p < 0,05$) і 53% ($p < 0,05$) відповідно по відношенню до активного контролю (табл. 6.2). Найбільш виражений вплив АЛК виявляла при тривалому застосуванні, що проявлялося збільшенням коефіцієнта антиамнестичної активності (75% на 12 добу і 81% на 20 добу дослідження) та тенденцією до підвищення кількості тварин зі збереженим умовним рефлексом на 20 день спостережень (табл. 6.3, рис. 6.3).

Результати, отримані в групі тварин, які отримували ніцерголін (10 мг/кг), були співставлявані по динаміці і значеннях з групою, що одержувала α -ліпоеву кислоту. Так, даний лікарський препарат на 39% ($p < 0,05$) і 54% ($p < 0,05$) перевершував за своїми значеннями показники ЛП₂ і ЛП₃ групи активного контролю. Значення K_{Aa} для 12 і 20 діб дослідження знаходилися на рівні 63% і 76% відповідно. Відсоток тварин з відсутнім навиком в зазначені періоди склав 50% ($p = 0,06$) і 63% ($p = 0,06$) (табл. 6.2-6.3, рис. 6.3).

Аналіз потенційної ноотропної активності донепезилу (10 мг/кг) показав, що після 12-го і 20-го дня введення препарату щурам тривалість латентного періоду УРПУ на 34% ($p > 0,05$) і 35% ($p > 0,05$) відповідно перевищували показники групи тварин активного контролю (табл. 6.2). Слід зазначити, що на відміну від інших досліджених препаратів, використання цього засобу супроводжувалося зниженням у динаміці коефіцієнта антиамнестичної активності (рис. 6.3): K_{Aa} складав 58% і 53% для 12 і 20 діб дослідження відповідно. При цьому відсоток тварин зі збереженим рефлексом на 12 добу дослідження становив 50%, а на 20 добу - 25%, що статистично значимо не відрізнялося від даних групи порівняння (табл. 6.2-6.3, рис. 6.3).

Отже, розвиток експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів призводить до погіршення процесів навчання та консолідації енграм пам'яті. При цьому застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне уповільнювати розвиток когнітивного дефіциту у щурів за умов експериментальної демієлінізуючої патології ЦНС.

Ймовірно, ефективність цитиколіну в даних умовах експерименту пояснюється здатністю препарату забезпечувати збереження цитоплазматичних і мітохондріальних нейрональних мембран внаслідок ослаблення активності фосфоліпази A_2 , активації нейрональних мітохондріальних цитохромоксидаз і інгібування глутамат-індукованого апоптозу [115, 294]. Терапевтична дія ліпоєвої кислоти, очевидно, реалізується за рахунок її антиоксидантних властивостей, що пов'язано з наявністю в структурі препарату тіолових груп [111]. Ноотропний і антиамнестичний вплив ніцерголіну може опосередковуватися його позитивним впливом на різні системи нейротрансмісії (ацетилхолінову, норадреналінову, дофамінову), передачу сигналів, транслокацію фосфоінозитид-протеїнкінази C і фактору росту нервових клітин [111]. Поліпшення когнітивних функцій донепезилом може бути наслідком його здатності підвищувати щільність Н-холінорецепторів в корі головного мозку, з дисфункцією яких певною мірою пов'язують порушення пам'яті і зниження здатності до навчання. Дія на пресинаптичні Н-холінергічні рецептори призводить до активації нейротрансмітерних систем, дефіцит яких спостерігається при розсіяному склерозі, хворобі Альцгеймера тощо [111].

6.3. Аналіз впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на рухово-дослідницьку активність в тесті «відкрите поле»

Серед нейропсихічних порушень, які мають місце при розсіяному склерозі, перш за все слід зазначити зниження інтелекту, розлади поведінки, сповільненість інтелектуальних та емоційних функцій, зниження пам'яті, депресію, відчуття неспокою [61, 64].

Це визначає наукову та практичну значимість системних порівняльних фармакологічних досліджень механізмів активності нейропротективних

засобів, що створює теоретичні передумови оптимізації фармакотерапії нейропсихологічних порушень у хворих на РС.

Однією з експериментальних методик оцінки поведінкових реакцій є тест «відкрите поле», який дозволяє визначити тип дії досліджуваного засобу на ЦНС, а також отримати важливу інформацію про рухову, дослідницьку та емоційну активність тварин.

Експериментальні дослідження виконані на білих безпорідних щурах масою 200 – 220 г, які утримувались на стандартному раціоні віварію (температура повітря $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, відносна вологість повітря 40-60%, світлий/темний цикл: 12/12 годин) та були розподілені на 7 груп: I – інтактні тварини (пасивний контроль), $n=10$; II – щури з ЕАЕ (активний контроль), $n=10$; III – ЕАЕ + метилпреднізолон (М: 3,4 мг/кг), $n=10$; IV – ЕАЕ + М + цитиколін (Ц: 500 мг/кг), $n=10$; V – ЕАЕ + М + α -ліпоева кислота (АЛК: 50 мг/кг), $n=10$; VI – ЕАЕ + М + ніцерголін (Н: 10 мг/кг), $n=10$; VII – ЕАЕ + М + донепезил (Д: 10 мг/кг), $n=10$.

Метилпреднізолон вводили у вену крапельно протягом тижня згідно клінічному алгоритму застосування препарату. З метою визначення фармакологічної активності засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу, їх застосовували додатково внутрішньошлунково один раз на добу з другого по 16-й день після індукції ЕАЕ (латентна фаза + клінічна фаза до закінчення піку захворювання). Тестування рухово-дослідницької активності та емоційного стану експериментальних тварин проводили в останню добу введення препаратів.

Результатами досліджень поведінкових реакцій гризунів у тесті «відкрите поле» встановлено, що у тварин з ЕАЕ реєструвалося суттєве зниження показників орієнтовно-дослідницької активності (табл. 6.4).

**Оцінка поведінкових реакцій у щурів з експериментальним алергічним
енцефаломієлітом в тесті «відкрите поле» ($M \pm m$)**

Показники	Групи тварин (n = 10)						
	Інтак-тні	ЕАЕ	М	М + Ц	М + АЛК	М + Н	М + Д
Горизонтальна активність кількість перетнутих квадратів за 3 хв	19,7 ± 2,09	8,8** ± 0,83	12,8* ± 1,19	15,3* ± 1,57	13,7* ± 1,71	13,2* ± 1,52	12,8 ± 1,75
Вертикальна активність кількість стійок за 3 хв	3,5 ± 0,52	1,5** ± 0,34	1,8 ± 0,33	3,3* ± 0,42	3,0* ± 0,37	2,8* ± 0,44	2,1 ± 0,38
Дослідницька активність кількість заглядань в «норки» за 3 хв	5,2 ± 0,68	2,3** ± 0,56	2,7 ± 0,47	4,3* ± 0,44	4,0* ± 0,26	3,9* ± 0,28	3,0 ± 0,49
Грумінг тривалість актів за 3 хв	14,7 ± 1,45	11,3 ± 1,19	12,5 ± 1,07	13,5 ± 1,44	12,0 ± 1,30	14,1 ± 1,25	12,9 ± 1,44
Дефекації кількість болюсів за 3 хв	1,2 ± 0,29	1,0 ± 0,26	1,3 ± 0,26	1,2 ± 0,33	1,1 ± 0,28	0,9 ± 0,23	1,0 ± 0,30

Примітки:

** – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з інтактним контролем);

* – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з активним контролем).

Зокрема, показник горизонтальної рухової активності у щурів з вказаною патологією був на 55% ($p < 0,05$) нижчим у порівнянні з групою пасивного контролю; при цьому також спостерігалось статистично значиме зменшення кількості проявів «норкового» рефлексу в 2,3 рази ($p < 0,05$). Крім того, характерним було і виражене пригнічення вертикальної рухової активності, яке проявлялось зниженням числа вертикальних підйомів на 56% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою інтактних тварин (табл. 6.4).

Показано, що введення метилпреднізолону (3,4 мг/кг у вену краплинно протягом тижня) усувало летальні наслідки, повністю попереджало розвиток неврологічних розладів у 20% тварин, а також зменшувало кількість гризунів

з важким перебігом ЕАЕ до 30%. При цьому спрямованість дії даного засобу базової терапії розсіяного склерозу (РС) характеризувалася переважним впливом на горизонтальну рухову активність: показник кількості перетнутих квадратів був на 44,5% ($p < 0,05$) достовірно вищим відповідних значень, зафіксованих в групі тварин з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (рис. 6.4). Слід зазначити, що показники, які характеризують вертикальну та дослідницьку активність, достовірно не відрізнялися від аналогічних, зафіксованих у тварин з модельованою патологією.

Імовірно, позитивна динаміка поведінкових реакцій гризунів під впливом метилпреднізолону пояснюється нормалізацією порушень в гематоенцефалічному бар'єрі, які розвиваються при ЕАЕ внаслідок інгібування протизапальних цитокінів та пришвидшення апоптозу імунних клітин. Оскільки олігодендроцити мають кортикостероїдні рецептори, кортикостероїди можуть також сприяти поділу олігодендроцитів і ремієлінізації аксонів [115].

Курсове застосування цитиколіну (500 мг/кг) з другого по 16 день після інюкуляції ЕГС на тлі терапії метилпреднізолоном попереджало розвиток патології у 33% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ. При цьому у щурів даної експериментальної групи орієнтовно-дослідницька активність під впливом зазначеного засобу посилювалася за рахунок зростання усіх досліджуваних показників. Так, число горизонтальних переходів, кількість заглядань в нірки та показники вертикальної активності достовірно збільшувалися на 73,9% ($p < 0,01$), 87% ($p < 0,05$) та 120% ($p < 0,05$) відповідно щодо показників тварин з ЕАЕ (рис. 6.4).

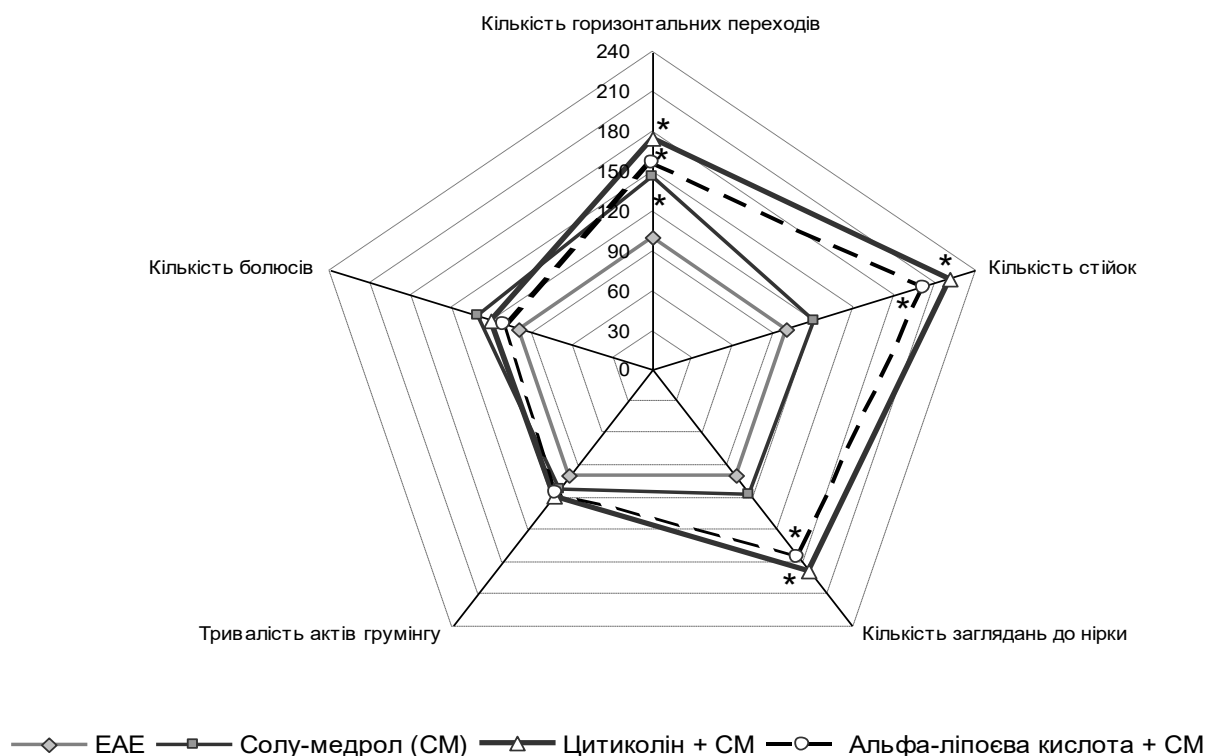


Рис. 6.4. Вплив метилпреднізолону (солу-медролу CM) та його комбінованого введення з цитиколіном та α -ліпоєвою кислотою на поведінкові реакції у щурів з EAE в тесті «відкрите поле»

Примітки:

* – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з показниками за умов EAE); зміни наведені у відсотках відносно показників EAE, прийнятих за 100%.

Очевидно, екзогенний цитиколін, будучи нейропротекторним засобом, приймає участь у біосинтезі мембранних фосфоліпідів нейронів. Фосфоліпіди формують структурно-функціональну основу нейрональних мембран, що забезпечують діяльність нервових клітин мозку в цілому. Цитиколін при екзогенному введенні швидко гідролізується в організмі до циркулюючих цитидину і холіну, з яких після всмоктування в системний кровотік ресинтезується ЦДФ-холін. Основним механізмом дії цитиколіну, яким опосередковуються його нейропротекторні властивості, є забезпечення цілісності цитоплазматичних та мітохондріальних нейрональних мембран, насамперед, шляхом ослаблення активності фосфоліпази A_2 , активації

нейрональних мітохондріальних цитохромоксидаз і гальмування глутамат-індукованого апоптозу [115].

Поєднане застосування антиоксиданту альфа-ліпоєвої кислоти і метилпреднізолону сприяло посиленню горизонтальної рухової активності дослідних тварин у 1,56 рази ($p < 0,05$). Крім того, спостерігалось зростання на 100% ($p < 0,05$) кількості підйомів на задні лапи та збільшення на 73,9% ($p < 0,05$) числа проявів «норкового» рефлексу (рис. 6.4).

Припускають, що терапевтична дія альфа-ліпоєвої кислоти за даних умов реалізується за рахунок її антиоксидантних властивостей, а також через каскад «цАМФ/протеїнкіназа А», що супроводжується зниженням рівня прозапальних цитокінів, інтерлейкіна-1 та гамма-інтерферону [125].

Подібні за характеристиками до попереднього препарату зміни були зареєстровані при введенні ніцерголіну на тлі терапії метилпреднізолоном. У тварин зазначеної експериментальної групи показники горизонтальної активності та кількість заглядань у нірки були вищими на 50% ($p < 0,01$) та 74% ($p < 0,05$) відповідно від аналогічних, отриманих в групі активного контролю. Крім того, реєструвалася виражена тенденція до активації вертикальної рухової активності, яка проявлялася збільшенням в 1,9 рази ($p > 0,05$) числа підйомів на задні лапки (рис. 6.5).

Ймовірно, нормалізація орієнтовно-дослідницької активності гризунів під впливом ніцерголіну може опосередковуватися його позитивним впливом на ацетилхолінову, норадреналінову і дофамінову системи нейротрансмісії, транслокацію фосфоінозїтид-протеїнкінази С і фактор росту нервових клітин [115].

Для донепезилу на даному проміжку експерименту встановлена відсутність впливу на показники рухово-дослідницької активності. Особливістю дії зазначеного засобу була лише тенденція до зростання на 45,4% ($p > 0,05$) показника кількості перетнутих квадратів (рис. 6.5), яка може бути наслідком здатності донепезилу опосередковано впливати на пресинаптичні М-холінергічні рецептори, що й призводить до активації

нейротрансмітерних систем, дефіцит яких спостерігається при РС, хворобі Альцгеймера тощо [245].

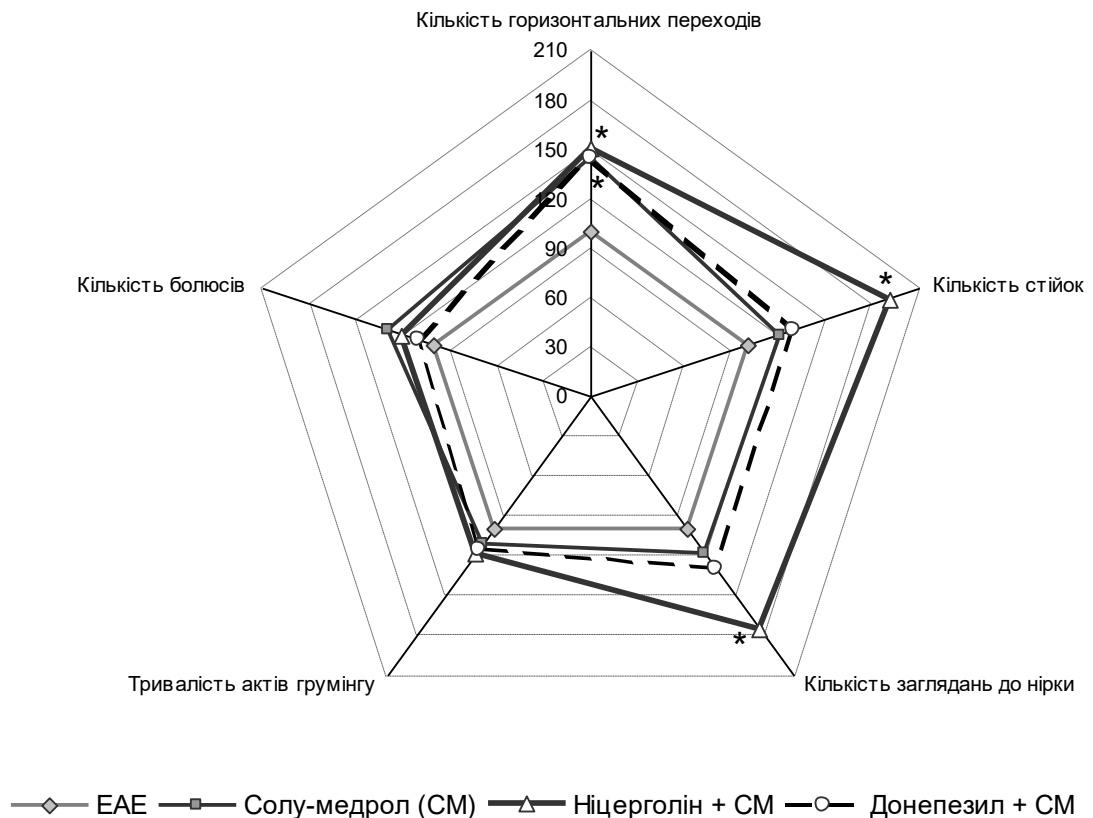


Рис. 6.5. Вплив метилпреднізолону (солу-медролу CM) та його комбінованого введення з ніцерголіном та донепезилом на поведінкові реакції у щурів з ЕАЕ в тесті «відкрите поле»

Примітки:

* – $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з показниками за умов ЕАЕ); зміни наведені у відсотках відносно показників ЕАЕ, прийнятих за 100%.

Отже, перебіг експериментального аутоімунного енцефаломієліту змінює поведінку тварин в тесті «відкрите поле» і характеризується суттєвим пригніченням рухової та орієнтовно-дослідницької активності експериментальних тварин. Застосування засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на тлі базової гормональної терапії ЕАЕ певним чином та у різному ступені здатне впливати на поведінкову активність тварин: цитиколін, альфа-ліпоева кислота та ніцерголін, але не

донепезил, сприяють нормалізації локомоторної та дослідницької активності у тварин з експериментальним алергічним енцефаломієлітом [127].

6.4. Вивчення впливу комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» на процеси енергозабезпечення і функціональний стан мітохондрій нейронів кори головного мозку за умов ЕАЕ

Стан енергозабезпечення нейронів головного мозку безпосередньо залежить від наявності достатніх рівнів макроергічних фосфатів і, в першу чергу – АТФ. Синтез АТФ відбувається в мітохондріях нейронів. За умов ішемії/гіпоксії активні форми кисню, особливо супероксид і пероксинітрил, що утворюються в додаткових («паразитарних») реакціях на початковій ділянці дихального ланцюга мітохондрій ініціюють порушення функції мітохондрій.

Мітохондріальна дисфункція приводить до порушення зворотного захвату медіаторів (норадреналіну, дофаміну, серотоніну), іонного транспорту, генерації та проведення імпульсу, синтезу білка, процесів транскрипції та трансляції, активізації «паразитарних» енергопродукуючих реакцій (гліколіз), що призводить до суттєвих енергозатрат в нейрональній клітині [101].

Мітохондріальна дисфункція є активною ланкою патогенезу нейродегенеративних процесів [9, 166]. Це зумовлює необхідність вивчення механізмів розвитку структурно-функціональних порушень мітохондрій в умовах розвитку нейродегенеративних захворювань, враховуючи той факт, що експериментально підтверджена чисельність процесів, які сприяють формуванню структурно-функціональних порушень в мітохондріях нейронів [101].

Даний розділ присвячений дослідженню функціонального стану мітохондрій і процесів енергообміну в нейронах головного мозку щурів, а

також гістоморфометричних показників його утворень за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Показано, що експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ) призводив до стійкого порушення енергетичного метаболізму мозкової тканини – активації анаеробного гліколізу (підвищення співвідношення лактат/піруват), гальмування окислення в циклі Кребса (зниження концентрації малату та ізоцитрату на 51% ($p < 0,05$) і 45% ($p < 0,05$) відповідно) та розвитку енергетичного дефіциту (зменшення вмісту АТФ на 42% ($p < 0,05$), АДФ – на 43% ($p < 0,05$) на тлі зростання пулу АМФ на 82% ($p < 0,05$) (табл. 6.5, табл. 6.6).

Таблиця 6.5

Оцінка показників енергетичного обміну в головному мозку білих щурів за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$

Умови експерименту	Лактат	Малат	Піруват	Ізоцитрат	Аспартат
	мкмоль/г тканини				
Інтактні (пасивний контроль)	2,41 $\pm 0,09$	0,45 $\pm 0,02$	0,498 $\pm 0,026$	0,288 $\pm 0,018$	11,7 $\pm 0,80$
Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)	4,86* $\pm 0,20$ (+101%)	0,22* $\pm 0,03$ (-51%)	0,25* $\pm 0,026$ (-49%)	0,158* $\pm 0,010$ (-45%)	6,95* $\pm 0,64$ (-40%)
ЕАЕ + метилпреднізолон	4,87 $\pm 0,21$ (+0,2%)	0,24 $\pm 0,04$ (+9%)	0,246 $\pm 0,050$ (-1,6%)	0,164 $\pm 0,030$ (+4%)	7,60 $\pm 0,50$ (+9%)
ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін	3,52** $\pm 0,31$ (-27%)	0,34 $\pm 0,05$ (+54%)	0,338** $\pm 0,030$ (+35%)	0,286** $\pm 0,018$ (+81%)	8,00 $\pm 0,66$ (+15%)

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

Як свідчать результати експерименту, перебіг ЕАЕ супроводжувався також гальмуванням компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів вироблення енергії, зокрема, малат-аспартатного шунта.

Відомо, що малат-аспартатний човник здійснює перенесення відновлених еквівалентів, що утворюються в цитоплазмі в ході гліколізу, в мітохондрії за умов ішемії. НАДН⁺, що утворюється в цитоплазмі при зниженому вмісті кисню, використовується для перетворення щавелевооцтової кислоти у малат, який проникає в мітохондрії і бере участь в експорті α -кетоглутарату. В мітохондріях малат трансформується до щавелевооцтової кислоти з утворенням НАДН, доступного для електроннотранспортного ланцюга (з 2 протонів утворюються 3 молекули АТФ). Метаболіт малату – щавелевооцтова кислота – перетворюється на α -кетоглутарат і аспартат. α -кетоглутарат покидає мітохондрії в обмін на малат, а аспартат обмінюється на глутамат. Перенесення відбувається за рахунок градієнта глутамату і високого внутрішньомітохондріального відношення глутамат/аспартат. Співвідношення НАДН/НАД⁺ і малат/щавелевооцтова кислота регулюється малатдегідрогеназою (МДГ).

Таблиця 6.6

**Оцінка вмісту аденілових нуклеотидів в головному мозку білих щурів
за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$**

Умови експерименту	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтактні (пасивний контроль)	$2,80 \pm 0,15$	$0,27 \pm 0,013$	$0,114 \pm 0,008$
Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)	$1,60^* \pm 0,08$ (-42%)	$0,153^* \pm 0,010$ (-43%)	$0,208^* \pm 0,021$ (+82%)
ЕАЕ + метилпреднізолон	$1,67 \pm 0,13$	$0,148 \pm 0,025$	$0,202 \pm 0,016$
ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін	$1,81^{**} \pm 0,11$ (+13%)	$0,178^{**} \pm 0,011$ (+16%)	$0,166 \pm 0,011$ (-20%)

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

Встановлено, що експериментальний алергічний енцефаломієліт викликав гальмування малат-аспартатного шунта, що виражалося в зменшенні рівня малату на 51% ($p < 0,05$) і аспартату на 40% ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин (табл. 6.5). Подібні зміни, ймовірно, були наслідками вторинної мітохондріальної дисфункції. Підтвердженням цієї гіпотези були результати дослідження функціональної активності мітохондрій, виділених з нейронів головного мозку. Так, в групі тварин з ЕАЕ спостерігалось збільшення швидкості відкривання мітохондріальної пори в 9,1 рази ($p < 0,05$) і падіння потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій на 78% ($p < 0,05$) (табл. 6.7).

Таблиця 6.7

**Оцінка показників дисфункції мітохондрій головного мозку за умов
ЕАЕ, n=10**

<i>Умови експерименту</i>	<i>Відкривання мітохондріальної пори, ΔE (540нм)</i>	<i>Потенціал мембрани мітохондрії (сафранін-О)</i>
<i>Інтактні (пасивний контроль)</i>	$0,019 \pm 0,001$	$50,9 \pm 2,05$
<i>Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)</i>	$0,193^* \pm 0,013$ (+915%)	$10,9^* \pm 1,21$ (-78%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон</i>	$0,186 \pm 0,015$	$13,0 \pm 1,21$
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін</i>	$0,065^{**} \pm 0,005$ (-66%)	$18,5^{**} \pm 1,8$ (+69%)

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

Очевидно, при нейродеструкції як ішемічної, так і запальної природи, NO (макрофагальний або екзогенний) пригнічує окислювальне фосфорилування у мітохондріях клітин-мішеней за рахунок оборотного зв'язування з цитохром С-оксидазою мітохондрії. Пригнічення електронного

транспорту в мітохондрії призводить до генерації супероксиду і, як наслідок, утворенню ONOO^- . Синтез пероксинітриту спостерігається в клітинах з високою активністю NO-синтази та ферментів, які продукують АФК (ксантиноксидаза, НАДН-оксиредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа, ферменти електронно-транспортного ланцюга). Останніми дослідженнями встановлено, що на початкових стадіях ішемії рівень пероксинітриту може знижуватися за посередництвом мітохондріальної нітроредуктази, яка відновлює його за допомогою НАДФН і НАДН у NO. Мішенями окисної та нітрозуючої атаки пероксинітриту є тіоли, CO_2 , металопротеїди, нуклеїнові кислоти, метаболітотропні трансмітери і ліпіди. Пероксинітрит, будучи відносно стійкою сполукою, при зміщенні рН в кислу сторону швидко протонується з утворенням основного продукту – нітратаніона, а також гідроксил-радикалу та діоксиду азоту, що зумовлює його окислювальні властивості. Тому на початкових стадіях ішемії пероксинітрит взаємодіє з тіолами за типом нітразування, в результаті чого утворюються нітрозотіоли; надалі при прогресуванні процесу і прояві лактатацидозу взаємодія відбувається за типом окислення з утворенням більш стійких дисульфідів. Ці реакції відіграють істотну роль у механізмі нейродеструкції шляхом зсуву тіолдисульфідної системи в бік окислених тіольних сполук, зниження відновного потенціалу клітини, порушення експресії генів за рахунок незворотного окислення цистеїнових залишків редокс-залежних доменів, роз'єднання MAP-кіназного каскаду. Пероксинітрит гальмує активність взаємодіючих метаболічних циклів метіоніну і цистеїну, пригнічуючи ключові ферменти, що регулюють рівень цистеїну, підвищуючи утворення гомоцистеїну. Пероксинітрит реагує і з метаболітотропним трансмітером CO_2 , утворюючи сильний нітрозилуючий агент – нітрозопероксикарбонат. Важливим механізмом нейротоксичної дії пероксинітриту є його реакція з

тіозином і утворенням нітротирозину. Пероксиднітрит значно пригнічує активність Cu,Zn-СОД і Mn-СОД шляхом нітрування її 34-го тирозинового залишку, а також зв'язування з міддю і зміною валентності. Пероксинітрит є специфічним агентом, який необоротно пригнічує мітохондріальне дихання при ішемії, безпосередньо взаємодіючи з залізом активних центрів ключових ензимів, а також нітрозуючи по S, N та O-елементах тіольні, фенольні, гідроксильні та аміногрупи білкової частини цих ензимів, а при більш вираженому прояві нітрозуючого стресу необоротно окислюючи їх. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до зниження заряду мітохондрій, що може ініціювати апоптичний процес, а за відсутності глюкози – некроз. Є дані про пряму активацію відкривання гігантської пори оксидом азоту, що приводить до виходу цитохрому C і запуску каспазного каскаду. Ці дані отримані при впливі на мітохондрії таких цитотоксичних дериватів NO, як пероксинітрит та іон нітрозонію, в механізмі дії яких лежить модифікація тіольних білків мітохондріальної пори. NO і його деривати можуть викликати перекисне окислення фосфоліпідів. Так, під дією цитотоксичних дериватів NO і гідроксилрадикала відбувається відкриття мітохондріальних пор, експресія і вихід в цитозоль проапоптичних білків. Відкривання пор відбувається за рахунок окислення або нітрозування тіольних груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортера), що перетворює його в проникний неспецифічний канал-пору. Відкривання пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» в «топку» субстратів окислення без утворення АТФ. Крім того, пошкоджені мітохондрії перетворюються в джерело АФК і проапоптичних факторів.

Як свідчать результати експерименту, призначення тваринам з ЕАЕ метилпреднізолону не мало достовірного впливу на досліджувані показники

енергетичного обміну та мітохондріальної дисфункції. При цьому 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% ($p < 0,05$) (табл. 6.5 – 6.7).

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. Вміст малату і аспартату в групі, що одержувала метилпреднізолон і цитиколін, достовірно не змінювався.

Отже, за умов ЕАЕ комбінація метилпреднізолону і цитиколіну обмежує активність малопродуктивного анаеробного гліколізу і підвищує аеробні реакції синтезу АТФ за рахунок активації окислення в циклі Кребса на трикарбоновій ділянці (підвищення рівня ізоцитрату). При цьому вказана комбінація не впливає на активність малат-аспартаного шунта [113].

Нами показано, що перебіг ЕАЕ призводив до пошкодження нейронів головного мозку, про що свідчило підвищення активності загальної КФК на 152% ($p < 0,05$) і ВВ-КФК на 72% ($p < 0,05$) в сироватці крові експериментальних тварин. При цьому введення тваринам з ЕАЕ метилпреднізолону не впливало на показники активності КФК і ВВ-КФК, а його сумісне призначення з цитиколіном сприяло зниженню загальної КФК на 38% ($p < 0,05$) і ВВ-КФК на 27% ($p < 0,05$), що свідчило про ослаблення інтенсивності нейродегенеративних процесів (табл. 6.8).

**Оцінка показників енергетичного обміну в сироватці крові білих щурів
за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$**

<i>Умови експерименту</i>	<i>КФК, МЕ/л</i>	<i>ВВ-КФК, МЕ/л</i>
<i>Інтактні (пасивний контроль)</i>	$13,4 \pm 1,2$	$6,82 \pm 0,28$
<i>Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)</i>	$33,8^* \pm 2,16$ (+152%)	$11,7^* \pm 1,09$ (+72%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон</i>	$30,1 \pm 3,0$ (-11%)	$10,7 \pm 0,59$ (-8%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін</i>	$20,8^{**} \pm 1,3$ (-38%)	$8,46^{**} \pm 0,81$ (-27%)

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

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% ($p < 0,05$) (табл. 6.9).

Як свідчать результати проведених досліджень, перебіг ЕАЕ викликав активацію нейроаптозу. Так, у сенсомоторній зоні кори тварин з експериментальною патологією спостерігалось підвищення щільності апоптичних та деструктивних клітин на 150% ($p < 0,05$). При цьому частка апоптичних клітин в зазначеній структурі головного мозку зросла практично в 5 разів ($p < 0,05$) (табл. 6.10).

**Оцінка морфо-функціональних показників нейронів сенсомоторної зони
головного мозку білих щурів за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$**

<i>Умови експерименту</i>	<i>Щільність нейронів (нейрон/мм²)</i>	<i>Площа нейронів (мм²)</i>	<i>Вміст РНК (E_{on})</i>
<i>Інтактні (пасивний контроль)</i>	1250,2 ± 25,5	83,0 ± 3,86	9,52 ± 0,33
<i>Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)</i>	1006,7* ± 10,7 (-19%)	91,5 ± 3,93 (+10%)	7,45* ± 0,62 (-21%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон</i>	1037,4** ± 6,8 (+3%)	84,2** ± 2,73 (-8%)	7,33 ± 0,44 (-2%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін</i>	1101,4** ± 7,4 (+9,4%)	84,2** ± 2,11 (-8%)	8,10 ± 0,42 +8,7%

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

Призначення тваринам з ЕАЕ метилпреднізолону призводило до достовірно значимого підвищення щільності нейронів сенсомоторної кори на 3% ($p < 0,05$) та зменшення їх площі на 8% ($p < 0,05$), що свідчило про прямий нейропротективний ефект гормональної терапії (табл. 6.9). Слід зазначити, що призначення метилпреднізолону в монотерапії не впливало на функціональні характеристики нейронів (рівень РНК практично не змінювався) і не впливало на показники нейроапоптозу (табл. 6.9, табл. 6.10).

Доведено, що призначення тваринам з ЕАЕ комбінованої терапії метилпреднізолону і цитиколіну 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% ($p < 0,05$) (табл. 6.9, табл. 6.10).

Таблиця 6.10

Оцінка показників апоптозу нейронів сенсомоторної зони головного мозку білих щурів за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$

<i>Умови експерименту</i>	<i>Щільність апоптичних і деструктивних клітин на 1 мм²</i>	<i>Доля апоптичних клітин, %</i>
<i>Інтактні (пасивний контроль)</i>	$59,4 \pm 6,89$	$3,4 \pm 0,96$
<i>Експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ, активний контроль)</i>	$148,0^* \pm 16,4$ (+149%)	$15,7^* \pm 1,7$ (+361%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон</i>	$141,6 \pm 11,0$ (-4%)	$15,0 \pm 1,0$ (-4%)
<i>ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін</i>	$119,2^{**} \pm 9,68$ (-19,5%)	$9,0^{**} \pm 1,0$ (-42%)

Примітки:

* – $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю;

** – $p < 0,05$ по відношенню до показників ЕАЕ (активного контролю).

Як відомо, цитиколін не виявляє прямої енерготропної дії; для препарату характерною є наявність вираженого мітопротективного ефекту. В роботах В.Ф. Беленічева і співавт. [113] показано, що цитиколін може зберігати цілісність внутрішньої мембрани мітохондрії, про що свідчить відновлення її потенціалу. Подібний механізм пов'язаний з відновленням рівня кардіоліпіну у внутрішній мембрані мітохондрій. Крім цього, виявлено, що цитиколін опосередковано, шляхом збільшення активності глутатіон-пов'язаних ферментів (глутатіон-редуктаза і глутатіон-трансфераза) регулює рівень відновленого глутатіону. Відновлений глутатіон, особливо мітохондріальний, гальмує окисну деструкцію Red-Oxi – чутливих ділянок мітохондріальної мембрани та формування стійкої мітохондріальної дисфункції. До того ж, за рахунок підвищення рівня відновленого глутатіону, цитиколін може знижувати реакції нітрозуючого стресу і гальмувати NO-

залежні механізми нейроапоптозу. Збереження відновлених еквівалентів глутатіону сприяє обмеженню цитотоксичних ефектів NO і попереджує накопичення нітротирозину. З рівнем NO пов'язаний баланс про- та антиапоптичних механізмів при нітрозуючому стресі. В умовах надлишку АФК (в першу чергу, пероксиднітри та гідроксилрадикала) окисній модифікації піддаються антиапоптозні білки (bcl-2 та інші), а надлишок NO-радикалу на тлі підвищеної активності iNOS посилює синтез проапоптичних білків (FAS і APO-1) при нейродегенеративних патологіях. При нейродегенерації, в т. ч. ЕАЕ, посилюється експресія прозапальних цитокінів (IL-1, TNF- α , HIF-1) і факторів, що призводять до транскрипції NF- κ B, AP-1, JNK, які опосередковано, зокрема, через активацію iNOS, ще більше підсилюють утворення цитотоксичних дериватів NO, які посилюють молекулярні реакції мітохондріальної дисфункції та нейроапоптоза.

Таким чином, 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 [113].

6.5. Аналіз впливу комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» на ультраструктуру фронтальної області неокортекса та гіпокампа за умов експериментального алергічного енцефаломієліту

Вивчення ультраструктурних змін тканин неокортексу та гіпокампу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту та проведеної комбінованої терапії, заснованої на сумісному використанні засобу базової гормональної засобу метилпреднізолону з нестероїдним протизапальним препаратом мелоксикамом або ад'ювантним анальгетиком габапентином чи нейропротектором цитиколіном виконане за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії.

6.5.1. Аналіз цитоархітекτονіки фронтальної області неокортекса

Результатами проведених досліджень показано, що в групі лабораторних щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) після курсового внутрішньовенного введення метилпреднізолону (М) порушень загальної цитоархітекτονіки кори фронтальної долі головного мозку на ультрамікроскопічному рівні не спостерігалось. Нейрони кори мали ядра кулястої форми з однорідними масами еухроматину та конденсованого хроматину; ядерце – без виражених патологічних змін. Цитоплазма нейронів характеризувалася помірною електронною щільністю, близькою до норми кількістю рибосом при зниженні числа полісом. Елементи гранулярного ендоплазматичного ретикулуму – без видимих патологічних змін (рис. 6.6).

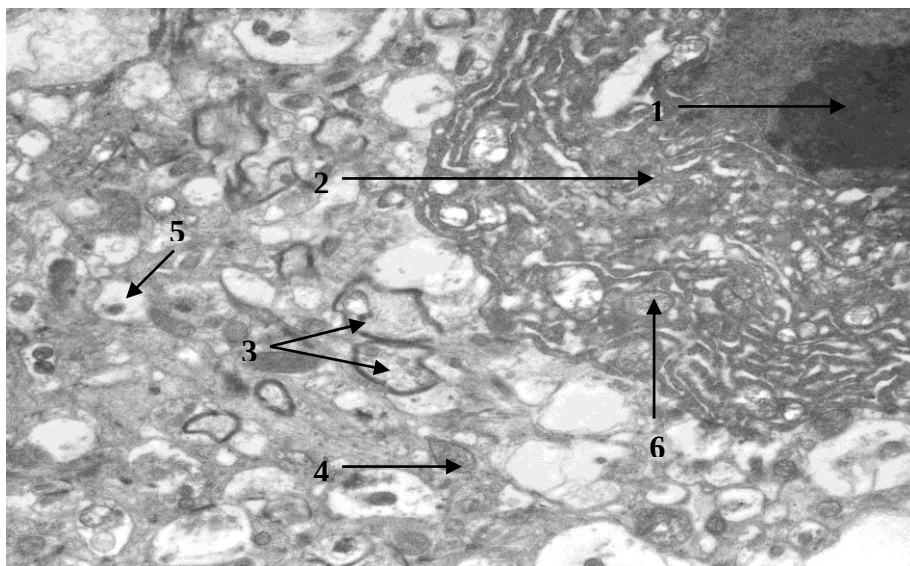


Рис. 6.6. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи ЕАЕ + М + цитиколін. 36. x 10000.

Позначення:

1. ядро нейрона;
2. розвинута хроматофінна субстанція;
3. мієлінові нервові волокна;
4. безмієлінові нервові волокна;
5. відсутність нейрофіламентів;
6. мітохондрія

Аналізом отриманих результатів встановлено, що в групі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом після курсового внутрішньошлункового введення цитиколіну на фоні базового застосування метилпреднізолону, порівняно з групою ЕАЕ + метилпреднізолон, зменшувався обсяг патологічних змін в мітохондріях: вони не мали виразних патологій в кількості та структурі крист, хоча мітохондріальний матрикс, як і в групі ЕАЕ + М, мав дещо знижену електронну щільність, а в плазматичній мембрані нейронів не виявлялося порушень. Крім того, нами відмічалось зниження ступеню явищ перинейронального набряку.

В даній групі досліджень олігодендроцити кори фронтальної долі головного мозку мали ядра овоїдної форми, заповнені однорідними масами еухроматину; кількість гетеро хроматину була зменшена. Цитоплазма клітин містила рибосоми, полісоми, мітохондрії без особливостей. Крім того, нами також зареєстровано зниження ступеню набряку цитоплазми олігодендроцитів порівняно з групою ЕАЕ + М (рис. 6.7).

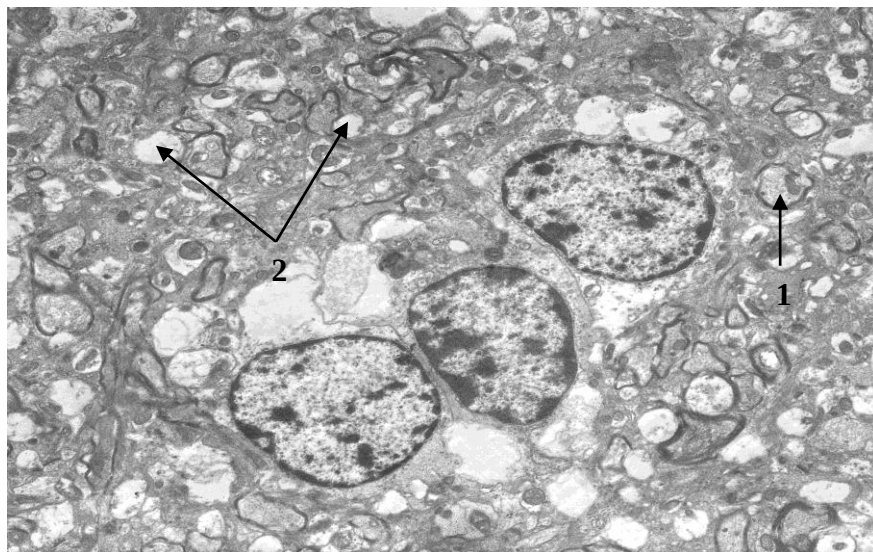


Рис. 6.7. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи ЕАЕ + М. 3б. x 6000.

Позначення:

1. мієлінові волокна;
2. безмієлінові волокна.

Отже, ультрамікроскопічні дослідження кори фронтальної долі головного мозку щурів при введенні метилпреднізолону та цитиколіну за

умов експериментального алергічного енцефаломієліту продемонстрували ряд позитивних змін в структурі нервової тканини, а саме:

- зниження ступеню набряку цитоплазми олігодендроцитів;
- зменшення обсягу патологічних змін в мітохондріях;
- відновлення електронної щільності цитоплазми та кількості рибосом до норми;
- нормалізацію структурної організації ядер нейронів.

Дані показники можуть розцінюватись як маркери компенсаторної дії цитиколіну на нейрони кори головного мозку за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу у лабораторних щурів.

6.5.2. Оцінка ультраструктурних змін гіпокампу

Аналізом результатів проведених досліджень показано, що в групі лабораторних щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) після курсового сумісного введення метилпреднізолону (М) та цитиколіну в ультраструктурі нейронів гіпокампу головного мозку на тлі зниження ступеню дифузійних порушень нейроцитів спостерігалось і істотне зниження їх некробіотичних змін (у формі поодиноких апоптотичних фігур). Така ситуація розцінювалася нами як позитивний вплив цитиколіну на адаптаційні механізми нейронів гіпокампа за експериментальних умов.

Оцінкою отриманих ультрамікроскопічних даних продемонстровано, що в групі активного контролю (щери з експериментальним алергічним енцефаломієлітом) апоптоз в нейронах відбувався переважно за мітохондріальним типом, причому більшість нейронів знаходилась на початкових стадіях апоптотичних процесів. Нами зареєстроване крупнодисперсне пошкодження нуклеоплазми нейронів з частково збереженою активністю ядра. В нейронах гіпокампу даної експериментальної групи небагато лізосом, а порушення гранулярного ретикулуму у перикарионі проявлялися набуханням і утворенням вакуолеподібних цистерн.

Індукція ЕАЕ викликала руйнування крист, часткову дефрагментацію зовнішніх мембран частини мітохондріального апарату клітин. Мітохондрії нейронів гіпокампу були як збільшені в розмірах з вакуолярним типом ушкодження, без ознак руйнування зовнішніх мембран, помірним кристолізисом, електронно-світлим матриксом, так і невеликих розмірів з помірно щільним матриксом. Гігантські мітохондрії не виявлені. Частина мітохондрій – з відносно стабільними кристами, містили гомогенний матрикс без електронно-щільних включень. До того ж, в даній серії експериментальних досліджень виявлялись і мітохондрії зі збереженою структурою крист.

Доведено, що в групі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом після курсового внутрішньошлункового введення цитиколіну на фоні базового застосування метилпреднізолону, порівняно з групою ЕАЕ, більшість нейронів не мали порушень перикаріона і містили ядра з активною нуклеоплазмою; зустрічались клітини з ознаками помірно обмеженої функціональної активності. Ядерна оболонка без фрагментації, не виражені явища хроматолізу, набряки та вакуолізація цистерн пластинчастого апарату та ендоплазматичного ретикулуму. Ступінь перинейронального набряку була незначною. При дослідженні гемокапілярів на люмінальній поверхні ендотеліальних клітин визначалась значна кількість мікроворсинок, стінка гемокапілярів і артеріол – без істотних патоморфологічних ознак; проте в стінці вену зустрічалася часткова деструкція перицитів і базальних мембран. В даній групі не спостерігалось перивенулярного набряку, що розцінювалось як компенсаторна дія цитиколіну на стан мікросудин при експериментальному алергічному енцефаломієліті.

Ультрамікроскопічне дослідження продемонструвало, що при сумісному введенні метилпреднізолону та цитиколіну за умов експериментального алергічного енцефаломієліту відростки і тіла олігодендроцитів і астроцитів мали переважно середню електронну

щільність, а міжклітинні простори між ними заповнені основною речовиною інтерстицію низької електронної щільності. В цитоплазмі тіл астроцитів та у їх розширених відростках виявлялися скупчення пучків філаментів і мітохондрій.

При дослідженні мієлізованих та немієлізованих відростків нейронів гіпокампу виявлялася наявність різної форми синапсів між окремими немієлізованими відростками аксонів, але частота їх спостережень була відносно невисока. В мієлізованих волокнах реєструвалися розвинені мітохондрії і нейрофіламенти (рис. 6.8).

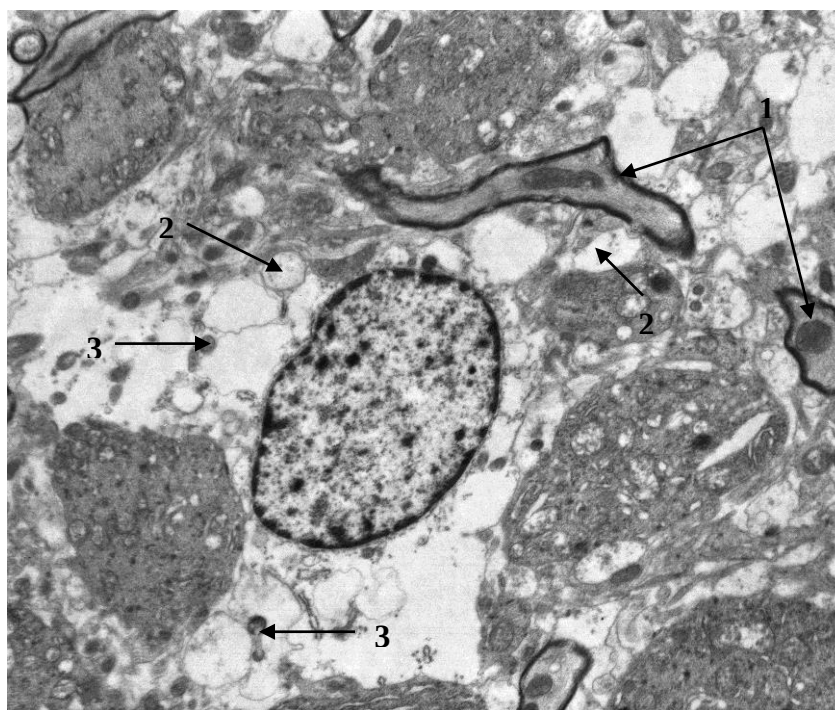


Рис. 6.8. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи ЕАЕ + М + цитиколін. 36.x 8000.

Позначення:

- 3. мієлінова оболонка нервового волокна;
- 4. безмієлінові волокна;
- 5. мітохондрія.

Як і в попередній групі експерименту, значна кількість мієлінових волокон мала добре розвинену аксоплазму і чітко організовану оболонку, а завитки мезаксона на периферії окремих волокон – неоднорідність упаковки та порушення електронної щільності (рис. 6.9).

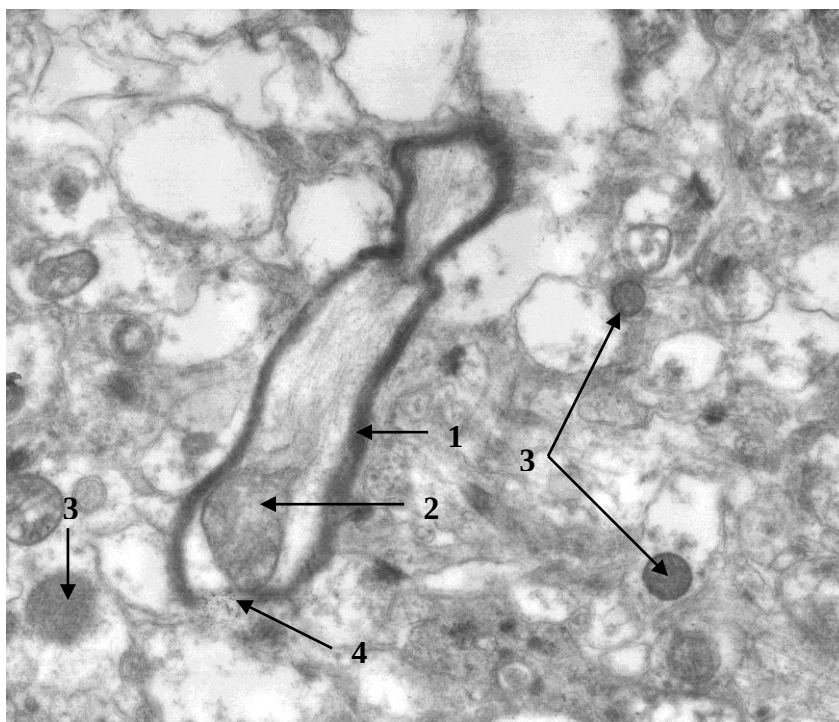


Рис. 6.9. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи ЕАЕ + М + цитиколін. 36.x 24000.

Позначення:

1. мієлінова оболонка нервового волокна;
2. аксон;
3. мітохондрія;
4. ділянка демієлінізації.

Нами встановлено, що в групі модельованого експериментального алергічного енцефаломієліту за умов курсового сумісного введення метилпреднізолону і цитиколіну спостерігалось відновлення асиметрично розподіленої електронної густини в пошаровій структурі мієліну гіпокампу, що вказувало на підвищення ізоляції аксона і сприяло покращенню функціонального проведення імпульсу. Локальні розпушення і разволокнення завитків мезаксону зустрічались у мієлінових волокнах з великим діаметром. Безмієлінові нервові волокна не мали патологічних ознак.

Таким чином, продемонстровано, що перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту призводить до суттєвих ультраструктурних змін

нейронального, гліального, а також синаптичного апарату в неокортексі та гіпокампі експериментальних тварин, які лежать в основі деструкції нейронів і подальшій ініціалізації процесів їх апоптозу.

Доведено, що експериментальна нейропротективна терапія цитиколіном на фоні базової гормонотерапії у щурів з ЕАЕ сприяє нормалізації морфофункціонального 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 [119].

6.6. Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу

Комбіноване застосування фізіологічно активних сполук направлене на оптимізацію їх сумісного фармакотерапевтичного ефекту, що передбачає ослаблення побічних реакцій інгредієнтів, зменшення їх доз за умов потенційного синергізму використовуваних компонентів і збільшення зручності прийому готових лікарських форм. Разом з тим, успішне застосування комбінованих лікарських форм може обмежуватися взаємодією їх складових на фізико-хімічному, фармацевтичному і біологічному рівнях (фармакологічна взаємодія) і вимагає попередньої оцінки можливої взаємодії і потенційної сумісності окремих фармацевтичних інгредієнтів.

Дана вимога може бути реалізованою з використанням підходів комп'ютерного моделювання, які враховують як взаємодію компонентів на хімічному рівні (утворення солей, перебіг реакцій конденсації, циклізації тощо), так і на рівні організму з урахуванням відомих механізмів розвитку біологічної відповіді.

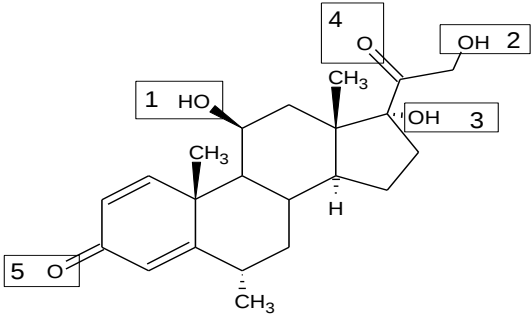
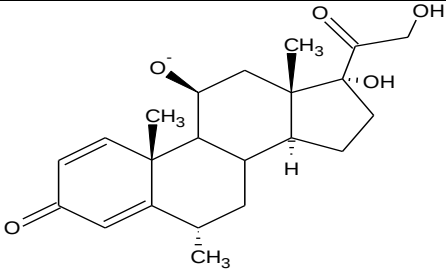
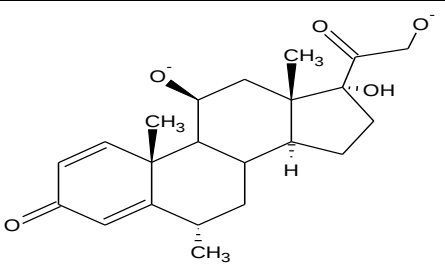
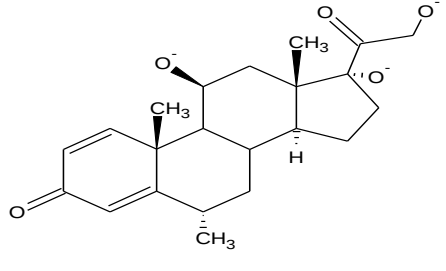
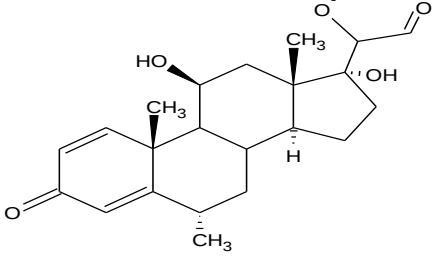
Відомо, що в терапії ряду хронічних захворювань передбачається використання декількох лікарських засобів з різних фармакологічних груп, що сприяє розвитку фармацевтичної поліпрагмазії. З практичної точки зору, перспективним видається комбіноване використання препаратів, фармакологічні ефекти яких є однонаправленими, але розвиваються за рахунок різних фізіологічних механізмів або шляхом впливу на різні стадії патологічного процесу.

В даному розділі наведені результати комп'ютерного прогнозування можливості комбінованого використання метилпреднізолону (як основного засобу базової терапії РС) та цитиколіну за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Взаємодія молекул на молекулярному рівні визначається їх хімічною будовою, наявністю і реакційною здатністю певних функціональних груп, враховуючи провідний характер електростатичної взаємодії (формування дисоціюючих солей / цвіттеріонів форм, протонування / депротонування в лімітуючих стадіях таутомірних перетворень тощо). Утворення катіонних / аніонних форм, залежне від умов рН середовища, слід визнати одним з провідних факторів, що обумовлюють можливість взаємодії розглянутих комбінаторних з'єднань.

Нами проведений аналіз функціональних груп та реакційної спроможності дослідних сполук. Так, у молекулі метилпреднізолону присутні п'ять потенційних функціональних груп - три гідроксильні (1-3) і дві карбонільні (4,5), що припускає можливість його протонування / депротонування і кислотно-лужні властивості. Рухливість протона зазначених гідроксильних груп, а також здатність до таутометрії сумарно припускають наявність існування п'яти протолітичних форм (табл. 6.11).

Структурна формула, функціональні групи та протолітичні форми метилпреднізолону

 Форма [BH₄]	
 Форма BH₂⁻	 Форма BH²⁻
 Форма B³⁻	 Форма (таутомер) BH₂⁻

Високі значення констант іонізації наведених форм (табл. 6.12) вказують на переважне знаходження в неіонізованому вигляді, що відбивається на таких фізико-хімічних характеристиках, як коефіцієнти розподілу в системах, що містять гідрофільні і ліпофільні фази. Так, для неіонізованої форми (BH₃) величина ліпофільності (logP) становить $1,99 \pm 0,54$, в результаті чого розрахована розчинність у воді, яка є найнижчою з усіх можливих протолітичних форм (0,13 г / л). Збільшення рН середовища і послідовне утворення заряджених форм (депротонування) призводять до збільшення гідрофільності молекули (внаслідок збільшення заряду і площі

полярної поверхні, Å²), підвищенню розчинності у воді і пониженню величини logD (табл. 6.12) за рахунок збільшення кількості груп - акцепторів протонів.

Таблиця 6.12

Фізико-хімічні та кислотно-лужні властивості метилпреднізолону

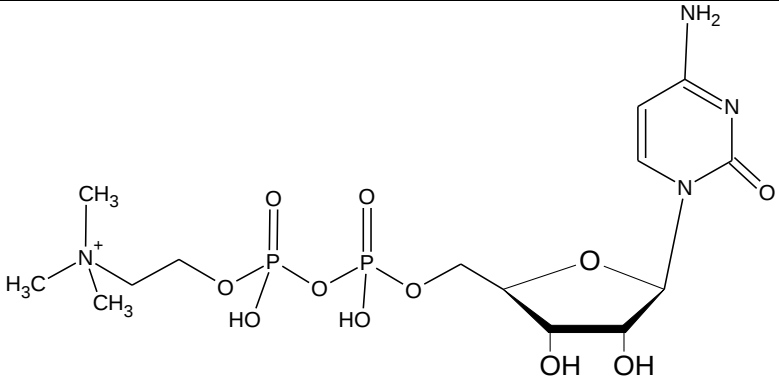
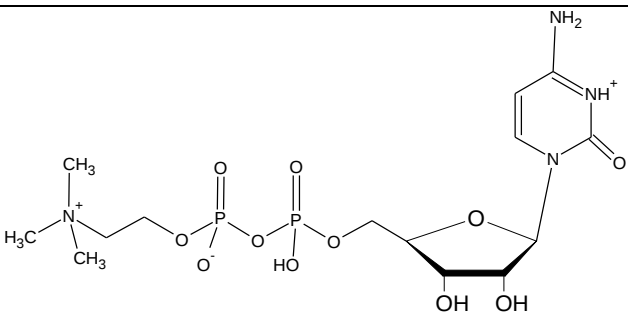
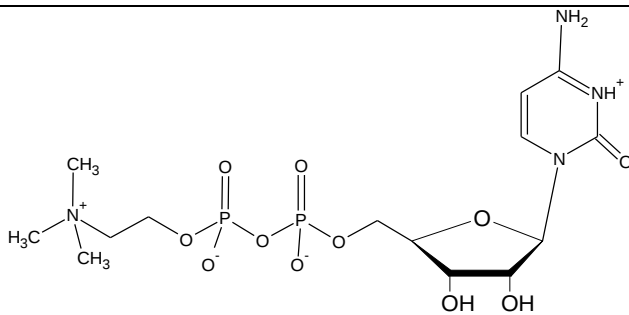
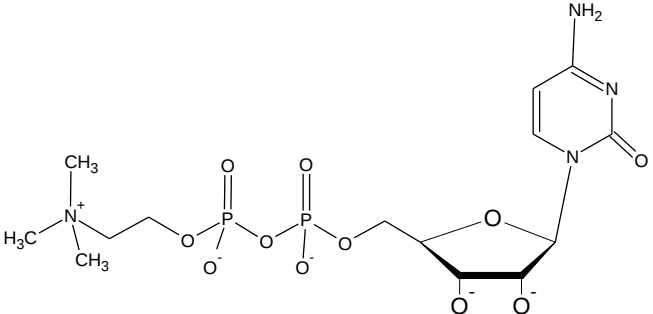
	BH_2^-	BH^{2-}	BH_2^- (таутомер)	B^{3-}	BH_3
<i>pKa</i>	14,59±0,7	12,98±0,1	12,48±0,7	13,14±0,2	-
<i>Розчинність, г/л (25 °C)</i>	60,4	1,01	0,31	1,4	0,13
<i>logD (logP)</i>	-0,69	1,08	1,6	0,47	1,99±0,54
<i>Кількість донорів протону</i>	0	1	2	3	3
<i>Кількість акцепторів протону</i>	5	6	7	8	9

Слід зазначити, що розглянуті гідроксильні групи характеризуються слабкою кислотністю - величини *pKa* для них знаходяться вище 11, що обумовлено відсутністю суттєвих негативних індукційних ефектів та низькою рухливістю відповідних гідроксильних протонів. Як було зазначено раніше, для метилпреднізолону можлива таутомерія, що приводить до утворення потенційної протолітичної форми BH_2^- (табл. 6.12); проте кислотність гідроксилу, що утворюється, статистично недостовірно відрізняється від величин *pKa* інших гідроксильних груп. Можливість до таутомерії карбонільної групи в положенні 3 прегнанового скелету дуже низька, оскільки цей процес пов'язаний зі стеричними труднощами при переході від конформації «крісла» цієї частини молекули до планарної ароматичної структури.

Структура цитиколіну і наявність декількох функціональних груп обумовлює існування для нього шести основних протолітичних груп (табл. 6.13), з яких найбільш ймовірними є форми BH_4^+ , BH_3 , і BH_2^- , оскільки величини їх констант іонізації *pKa* (табл. 6.14) припускають переважне існування в вигляді даних форм в діапазоні фізіологічного pH.

Таблиця 6.13

Структурна формула, функціональні групи та протолітичні форми цитиколіну

Цитиколін  Форма BH_4^+	
 Форма BH_4^+	 Форма BH_3
 Форма B^{3-}	

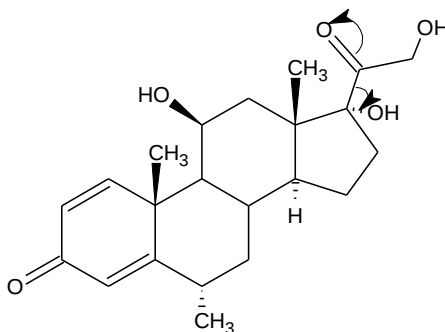
Таблиця 6.14

Фізико-хімічні та кислотно-лужні властивості цитиколіну

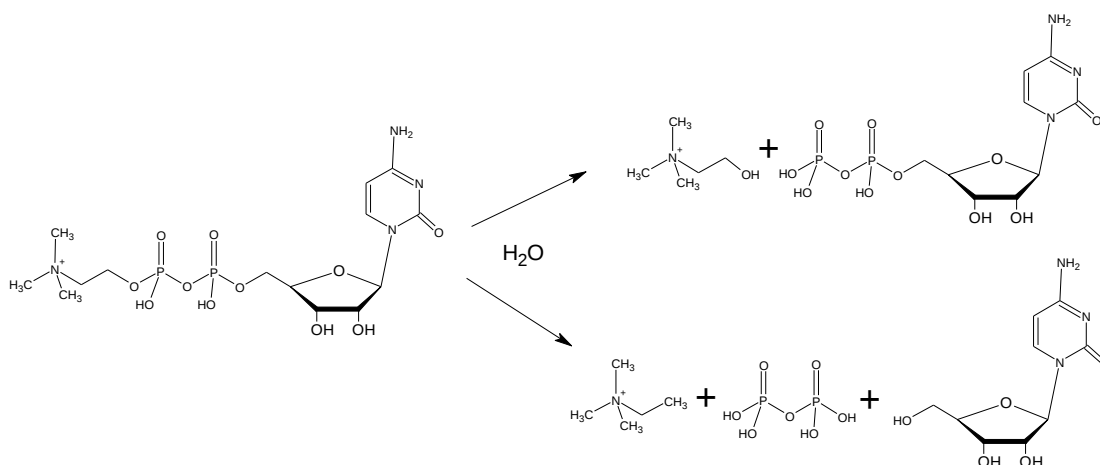
Форма	BH_4^+	BH_3	BH_2^-	BH^{2-}	B^{3-}
pK_a	$0,97 \pm 0,5$	$1,41 \pm 0,5$	$3,26 \pm 0,7$	$13,36 \pm 0,7$	$14,21 \pm 0,7$
Розчинність, г/л (25 °C)	-7,07	-	-	-	-
$\log D$ ($\log P$)	6	5	4	3	2
Кількість донорів протону	10	12	13	14	15

Присутність зарядженого залишку холіну в молекулі обумовлює високу розчинність у воді і гідрофільний характер молекули, однак разом з тим не дає можливості провести теоретичний розрахунок величини його ліпофільності, для якої все ж відомо експериментальне значення (-7,07, табл. 6.14). Четвертинний атом азоту залишку холіну не проявляє основних властивостей, електронна пара аміногрупи в кільці піримідину бере участь у сполученні, через що основні властивості даної групи знижені, а присутність залишку фосфорної кислоти (фрагмент пірофосфату) визначає переважно кислий характер даного з'єднання і можливість існування як в вигляді цвіттеріонів (внутрішньої солі), так і у вигляді інших солей (цитиколін використовується в клінічній практиці найчастіше у формі натрієвої солі). Формально можливі протолітичні форми BH_2 і B_3^- в реальності не реалізуються, оскільки стійкі лише при високих значеннях рН, коли гідроліз вихідної молекули цитиколіну протікає з високим ступенем і швидкістю.

Наступним важливим етапом фармакокінетичного аспекту використання метилпреднізолону та цитиколіну став аналіз хімічних властивостей та можливої взаємодії. Гідроксильні групи в молекулі метилпреднізолону, як показано з розрахованих величин pK_a , мають слабку кислотність, тому можливість протікання реакцій алкілювання по них (припускаючи їх участь в реакціях нуклеофільного заміщення в якості алкоксиліруючих агентів) слід визнати мінімальною. Однак можливим є участь метилпреднізолону в реакціях нуклеофільного приєднання по карбонільній зв'язку аліфатичного заступника прегнанового кільця (положення 17):



Для цитиколіну, в силу хімічної структури і лабільності ефірних зв'язків, очікуваним є протікання гідролізу з утворенням холіну, цитидиндіфосфата і цитидину:



Прогнозуванням фармакологічної взаємодії розглянутих з'єднань показано, що вона може розвиватися на рівні зміни фармакокінетики компонентів (вплив на процеси всмоктування, розподілу, зв'язування з транспортними білками крові і компонентами тканин, конкуренція за специфічні системи метаболізму, і зміни кліренсу) і їх фармакодинаміки (вплив на суміжні або однакові рецепторні системи, потенціювання або зменшення фармакологічної відповіді через функціонального антагонізму). У процесі всмоктування можуть впливати речовини, перенесення яких здійснюється однаковими транспортними системами і які подібні за хімічною будовою (володіють ізостеричних структурою). Найчастіше активний транспорт характерний для ендогенних сполук, що є невід'ємним компонентом життєдіяльності організму, одержуваним ззовні (аліментарно). З цієї позиції близькими до природних сполук є метилпреднізолон (синтетичний аналог стероїдного гормону) та цитиколін, що є аналогом ендогенного з'єднання (Na^+ -залежний транспортер для нуклеозидів виявляється на мембрані щіткової кайми ентероцитів по всій довжині тонкої кишки).

В цілому, враховуючи високу біодоступність зазначених сполук (табл. 6.15) також можна припустити істотну роль у процесах переносу простої

дифузії, при якій взаємний вплив даних сполук на всмоктування одна одної є мінімальною. Витіснення з комплексу з білками плазми характерно тільки для тих сполук, які є високоліпофільними, тому в комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» цей тип взаємодії не відіграє суттєвої ролі.

Таблиця 6.15

Фармакокінетична / фармакологічна характеристика препаратів

	<i>Метилпреднізолон</i>	<i>Цитиколін</i>
<i>Молекулярна маса</i>	374,47	488,11
<i>Період напіввиведення, $T_{1/2}$</i>	~2 часа	<2-5 часов
<i>Біодоступність</i>	80 % (п/о)	>95 %
<i>З'ясування с білками плазми крові</i>	40-90 %	-
<i>Ферменти, які беруть участь в метаболізмі</i>	CYP3A4	Гідролази
<i>Механізм дії</i>	Взаємодія зі специфічним цитозольним кортикостероїдним рецептором. Вплив на синтез мРНК. Пригнічення активності фосфоліпази A_2 , циклооксигенази (ЦОГ ₂), зменшення продукції факторів запалення	Метаботропний механізм дії. Участь в процесах синтезу ліпідних компонентів мембран (донор холіну). Специфічні рецепторні системи не виявлені

Метилпреднізолон взаємодіє зі специфічними цитоплазматичними рецепторами, стимулює синтез специфічних мРНК та призводить до утворення ліпокортину, який гальмує активність фосфоліпази A_2 і пригнічує вивільнення простагландинів, ендоперекисів, лейкотрієнів (фактори запалення). Пригнічує вивільнення циклооксигенази (ЦОГ), головним чином ЦОГ-2. Знижує проникність капілярів, викликає стабілізацію мембран і

зменшення виділення протеолітичних ферментів. У високих дозах метилпреднізолон може підвищувати збудливість тканин мозку і сприяє зниженню порогу судомної готовності. Протишокову і антитоксичну дію пов'язують з підвищенням артеріального тиску (за рахунок збільшення концентрації циркулюючих катехоламінів та відновлення чутливості до них адренорецепторів, а також вазоконстрикції), зниженням проникності судинної стінки, мембранопротекторними властивостями, активацією ферментів печінки, що беруть участь у метаболізмі ендо- та ксенобіотиків. Стимулює надлишкову продукцію соляної кислоти і пепсину в шлунку.

Цитиколін є природною сполукою, що містяться в організмі людини і природному раціоні, будучи джерелом холіну і цитидину. Володіє нейропротективною і ноотропною активністю. Стимулює біосинтез структурних фосфоліпідів мембран нейронів, що сприяє поліпшенню функції мембран, в тому числі функціонуванню іонообмінних насосів і нейрорецепторів. У зв'язку з присутністю в якості постійної ендогенної сполуки в організмі і через складність кількісного визначення екзогенного і ендогенного цитиколіну, класичні фармакокінетичні дослідження провести неможливо. Переважний метаболізм препарату здійснюється через гідроліз до цитидину і холіну вже в просвіті кишечника з подальшою утилізацією різними біохімічними шляхами. Утворені метаболіти також володіють метаботропною активністю. Проникаючи через гематоенцефалічний бар'єр, холін і цитидин надалі використовуються для ресинтезу цитиколіну, концентрація якого є лімітуючим фактором при біосинтезі фосфатидилхоліну. При його застосуванні також відзначається збільшення рівнів ацетилхоліну, норадреналіну та дофаміну в ЦНС.

Також сприяє уповільненню біодеградації сфінгомієліну (компонент клітинних мембран нейронів) і кардіоліпіну, відновлює активність Na^+ / K^+ -АТФ-ази та глутатіонредуктази, збільшуючи синтез глутатіону і виявляючи антиапоптичний ефект.

Отже, в представленій комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Також від спільного застосування метилпреднізолону з цитиколіном слід очікувати посилення його стимулюючої дії. Виходячи з відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямою (опосередковано через метаболічні процеси) механізмі розвитку терапевтичного ефекту розглянутих сполук, з фармакокінетичної точки зору комбінація метилпреднізолону з цитиколіном є безпечною та ефективною [142].

6.7. Резюме

Аналіз отриманих результатів, описаних у цьому розділі, дозволяє зробити наступні висновки:

1. Інокуляція енцефалітогенної суміші на 9 - 11 добу у 91,7% тварин викликає розвиток ЕАЕ, який характеризується важким і тривалим перебігом, сприяє розвитку порушень мнестичних процесів та орієнтовно-дослідницької активності у експериментальних тварин, що свідчить про розвиток когнітивного дефіциту за умов цієї патології.

2. Курсове введення цитиколіну, нейровітану і α -ліпоевої кислоти при ЕАЕ за умов базової терапії метилпреднізолоном в різному ступені гальмує розвиток патології; при цьому у хворих тварин алергічний енцефаломієліт має більш короткочасний перебіг переважно в середньоважкій або легкій формі.

3. Здатність запобігати розвитку неврологічних порушень і зменшувати тяжкість і тривалість перебігу експериментального еквіваленту розсіяного склерозу ослаблюється в ряду цитиколін > α -ліпоева кислота > нейровітан.

4. Застосування засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу у різній мірі зменшує прояви когнітивної дисфункції, покращуючи процеси навчання та сприяючи збереженню умовної навички.

5. За ступенем ноотропної активності за умов експериментального алергічного енцефаломієліту у щурів досліджувані препарати можна розмістити наступним чином: цитиколін > α -ліпоева кислота $\approx$ ніцерголін > донепезил.

6. Цитиколін, але не α -ліпоева кислота, ніцерголін чи донепезил, зменшують дефіцит просторової пам'яті.

7. Курсове введення засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу у різній мірі викликає нормалізацію показників рухової та орієнтовно-дослідницької діяльності у тварин з ЕАЕ.

8. Здатність нормалізувати поведінкові реакції щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом ослаблюється в ряду цитиколін > α -ліпоева кислота $\approx$ ніцерголін >> донепезил.

9. За умов ЕАЕ комбінація метилпреднізолону і цитиколіну нормалізує функціональну активність мітохондрій головного мозку, обмежує активність малопродуктивного анаеробного гліколізу і підвищує аеробні реакції синтезу АТФ за рахунок активації окислення в циклі Кребса на трикарбоновій ділянці, ослаблює інтенсивність нейродегенеративних процесів.

10. В комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проблема больового синдрому у хворих на РС на сьогодні набуває все більшої актуальності. 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, при цьому не менше 40 % з них характеризують його як постійний [4 – 8, 42, 70, 110, 157, 158, 186, 194, 209]. Хворі на РС при наявності больового синдрому більш інвалідизовані і соціально дезадаптовані, ніж хворі з аналогічним неврологічним дефектом, але без больового синдрому. Однією з найбільш актуальних проблем є діагностика чинників, що викликають та підтримують хронічний біль.

В рамках соматогенних больових синдромів у хворих на розсіяний склероз найчастіше описують біль в спині – від 20% - 35% випадків у перші 5 років хвороби, до 83% при тривалості захворювання понад 15 років, суглобові болі – до 7,5% спостережень [5, 7]. Найбільш обговорюваними причинами виникнення болю вважають рухові розлади, порушення м'язового тону, остеопороз, тривалу іммобілізацію і прогресування остеохондрозу [194].

Невропатичні (неврогенні) больові синдроми при РС з'являються в разі залучення в патологічний процес периферичних або центральних структур, пов'язаних з проведенням ноцицептивних сигналів, тобто при пошкодженні структур біль-провідної системи [4, 6, 17].

Невропатичний біль може проявлятися як дизестезичний або трункальний [6]. При РС поверхневий дизестезичний чи диференціальний біль описується пацієнтами як такий, що викликає відчуття опіку, свербіння, повзання мурашок, стягнутості, проходження електроструму різної тривалості. Дизестезичні болі звичайно спостерігаються в пацієнтів з переважним втягненням в процес малих С-волокон (уражується поверхнева

больова, температурна чутливість, розвивається вегетативна дисфункція). Глибокий трункальний біль характеризується як ниючий, часом ріжучий. До цього ж типу можна віднести і м'язовий біль, що проявляється судомами, тягнучо-давлячими відчуттями та болючістю м'язів при пальпації. Вони звичайно довготривалі та можуть змінювати інтенсивність. Трункальний біль зустрічається при компресії спинномозгових корінців, тунельних невропатіях, і пов'язаний з дисфункцією A_{Δ} -волокон [4, 167, 194, 213].

Хронічні больові дизестезії і парестезії у хворих на розсіяний склероз, за даними різних авторів, спостерігаються від 14 до 41% [42, 70, 110, 157, 158]. Пацієнти скаржаться на оніміння, «замороженість», відчуття «повзання мурашок», поколювання, печіння, переважно в долонях і стопах. Клінічний огляд у більшості хворих (60 – 95%) може виявити порушення больової і температурної чутливості, частіше мозаїчні або за поліневротичному типу [4 – 8].

У закордонній літературі в якості рідкого симптому при РС описується комплексний регіонарний больовий синдром (КРБС) – поодинокі описові випадки. Він проявляється нестерпними болями, гіперпатією, гіпералгезією, що супроводжуються вегетативно-трофічними порушеннями (набряк, зміна забарвлення шкірних покривів). У літературі описана кореляція таких больових синдромів з формуванням порожнин в спинному мозку, схожих на сирінгомієлітичні, але сформувалися як результат демієлінізації [30]. У вітчизняній літературі, за пропозицією А. М. Вейна, подібні стани позначаються терміном «ангіотрофалгічний синдром» (АТАС).

Все вище зазначене зумовлює необхідність використання засобів специфічної фармакологічної терапії, направленої на усунення цих відхилень. Однак всіма дослідниками даної проблеми наголошується різноманіття причин і характеру болю при РС (Chatel M, Lanteri-Minet M, 2001). Немає єдиної думки на причини виникнення, механізми розвитку, згідно з віком, статтю, тяжкістю хвороби. Досі залишаються дискутабельними питання співвідношення болю і клінічних особливостей РС

(Moulin D. Тобто, Foley K. M., Ebers G., 1988) (Archibald C. J., McCrath P. J., Ritvo P. G. et al., 1994). В даний час не існує єдиної систематизації больових синдромів при розсіяному склерозі, а також не висвітлені питання їх інформаційно-структурного аналізу.

У доступній нам літературі знайдено лише поодинокі повідомлення про можливий початок розсіяного склерозу з больового синдрому. Біль, як симптом дебюту, описують від 8 до 21% випадків (Fryze W, Zaborski J, Czlonkowska A, 2002; Indaco A., Lachetta C, Nappi Z et al, 1994). Не виявлено жодного дослідження, спеціально присвяченого аналізу больового дебюту, можливості прогнозування перебігу захворювання в залежності від виду больового синдрому, який сформувався в самому початку хвороби.

Ефективна терапія больового синдрому при розсіяному склерозі в даний час також є актуальною і в повному обсязі не вирішеним завданням. Проведені в Данії дослідження показали, що повноцінну знеболюючу терапію отримують тільки 42% хворих РС (Stenager E, Knudsen L, Jensen K, 1992).

Водночас, як зазначається дослідниками проблеми РС, захворювання є не тільки запальним за своєю природою, як це вважалося багато років, але і нейродегенеративним. Підтвердженням наявності нейродегенеративного компонента є поступове прогресування захворювання; наявність стабільних «чорних дір» на МРТ; морфологічно доведені загибель аксонів, апоптоз олігодендроцитів і нейронів не тільки в осередках демієлінізації, але і в «нормальній» білій і сірій речовині, що підтверджується зниженням рівня N-ацетиласпартата (NAA), виявлюваного при МР-спектроскопії (МРС); наростаюча атрофія головного і спинного мозку і розвиток когнітивних порушень.

Існує кілька гіпотез наявності зв'язку запальних і нейродегенеративних змін при РС. Згідно з однією з них, запалення первинно і саме запальні процеси в ЦНС призводять до нейродегенерації. За іншою – запалення і нейродегенерація при РС існують незалежно один від одного. І нарешті є

гіпотеза, що первинна нейродегенерація з апоптозом мієліноутворюючих клітин - олігодендроцитів, а запальна реакція в мозку вторинна. Не виключено, що всі ці варіанти патогенезу дійсно мають місце при різних типах перебігу РС. Найбільш обґрунтованою представляється гіпотеза про те, що запалення і нейродегенерація лише частково взаємопов'язані – на ранніх етапах розвитку ремітуючого РС пошкодження аксонів є прямим наслідком запальної аутоімунної атаки, а при вторинно - і первинно-прогресуючому РС нейродегенеративні процеси розвиваються незалежно від запалення. Існує думка, що в цих випадках розвиток нейродегенерації схожий з постполіо - синдромом, коли клітини, що «вижили» після вірусної інфекції, через багато років піддаються апоптозу. Таким чином, при РС пошкоджені запальним процесом клітини можуть гинути через кілька років без розвитку запалення. І все ж у численних роботах показано, що висока частота загострень (прояв запалення) призводить до швидкого розвитку незворотного неврологічного дефіциту (прояв нейродегенерації). Цей факт дає підставу для раннього початку проведення нейропротективної терапії [21, 163, 164, 313], яка «розшиватиме» найбільш «вузькі місця» нейропротективного та антиоксидантного захисту. Натепер нейропротекція розсіяного склерозу визначається як захист нейронів і глії від ушкодження, яке викликається екзо- або ендогенними шкідливими агентами чи процесами [21]. 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 [162, 163].

З урахуванням викладеного, метою нашої роботи було шляхом порівняльного системного аналізу і використання комплексних методичних підходів експериментально обґрунтувати шляхи фармакологічної корекції больового синдрому та медикаментозного захисту мозку за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Для вивчення РС нами використана експериментальна модель з аутоімунними механізмами запальної демієлінізації [64, 76, 207, 239] – модель експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ). Необхідно відзначити, що, як і при РС, клінічна картина ЕАЕ неоднорідна й варіює зі ступенем важкості захворювання. Незважаючи на це, у різних видів експериментальних тварин можна виділити загальні неврологічні прояви. Найхарактернішою є паралітична форма з моно-, пара- і тетрапарезами, порушеннями зорового й окорухового нерва й провідникових порушень чутливості [76, 239, 317]. Другою за частотою можна назвати атактичну форму ЕАЕ, що характеризується втратою рівноваги, ходою «з підстрибуванням», ходінням по колу. Найрідше зустрічаються коматозні й судомні форми розвитку ЕАЕ [239].

До гістологічних ознак ЕАЕ відносять поява в спинному мозку й білій речовині півкуль, мозочку й стовбурі головного мозку осередків запалення, що характеризуються інфільтрацією моноклеарними клітинами, головним чином лімфоцитами (Th1 і Th2), руйнуванням мієлінової оболонки аксонів [76]. Характерним також є некроз судинної стінки з геморагіями й дистрофічні зміни в нейронах на гострій стадії. Із затуханням запального процесу спостерігається зменшення числа поліморфноядерних елементів в інфільтраті, новоутворення капілярів, а згодом і ремієлінізація.

Вважається, що більшість білків нервової системи є потенційно енцефалітогенними: загальний білок мієліну, протеоліпідний компонент, глікопротеїн мієліну олігодендроцитів. Антигени, представлені в компактному мієліні – загальний білок мієліну, протеоліпідний компонент, – викликають порушення в зонах з найбільш щільними мієліновими оболонками: спинному мозку й стовбурі головного мозку. Глікопротеїн мієліну олігодендроцитів – антиген, що локалізується винятково на поверхні мієлінової оболонки, викликає ушкодження в областях з тонкою мієліновою оболонкою [214]. Різні аутоантигени, можливо, включаються в процес на різних стадіях РС – феномен, відомий як «епітопне поширення», що полягає в каскадному вивільненні нових антигенів та з'явленню змінених антигенів [65, 184]:

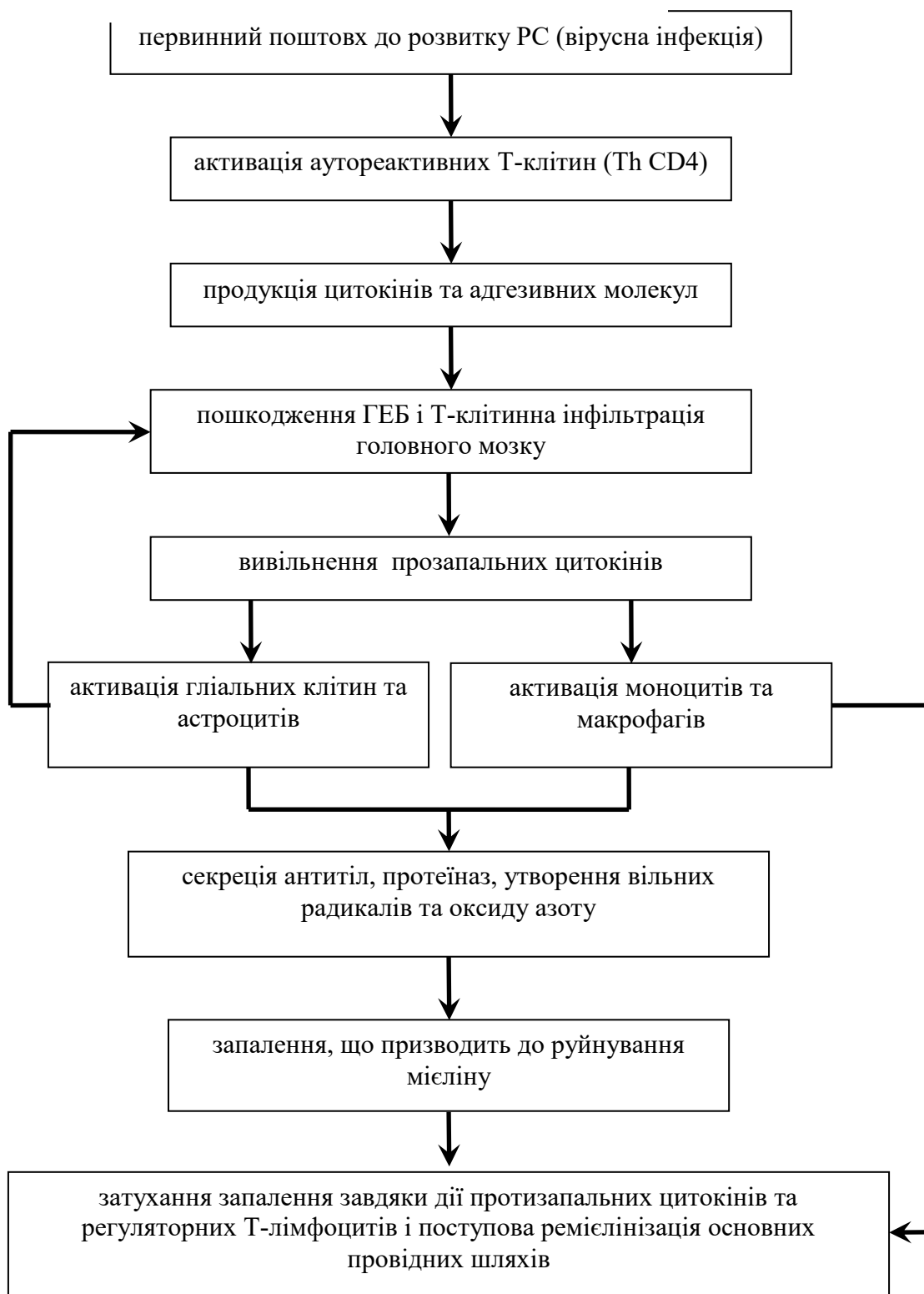


Схема змін в імунній і нервовій системах при розсіяному склерозі

(за Т.Ю. Степановою, 2004 [184])

Аналіз результатів проведених нами досліджень вказує на те, що за умов одноразової підшкірної інюкуляції енцефалітогенної суміші в повному

ад'юванті Фрейнда у тварин контрольної групи реєструвався розвиток неврологічних порушень різного ступеня тяжкості; летальний результат захворювання був зафіксований у 8,3% випадків спостережень.

Показано, що після індукції ЕАЕ у щурів групи контролю перші неврологічні розлади були зафіксовані на 9 - 11 добу. Пік клінічних проявів алергічного енцефаломієліту у більшості тварин розвивався на 12 - 14 добу і тривав в середньому 4 дні; при цьому тривалість ЕАЕ склала $16,4 \pm 1,8$ днів при середньому кумулятивному індексі 27,2 балів. При цьому на піку клінічних проявів ЕАЕ кількість тварин з клінічним індексом $\frac{1}{2}$ - $2 \frac{1}{2}$ балів склала 41,7% щурів, що відповідало легкому ступеню «захворювання», а важкий перебіг ЕАЕ спостерігалось у 58,3% гризунів (клінічний індекс 3 - 6 балів).

Встановлено, що перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту змінював поведінкові реакції щурів та викликав розвиток когнітивної дисфункції, що проявлялося суттєвим пригніченням рухової та орієнтовно-дослідницької активності експериментальних тварин і ослабленням процесів навчання та консолідації енграм пам'яті. Зазначені результати в цілому узгоджуються з даними клінічних досліджень, які свідчать, що структура когнітивних порушень при РС досить багатогранна і включає в себе зниження показників загального інтелекту і його вербальної і невербальній складових, порушення уваги, короткочасної пам'яті та її складових - безпосередній і оперативної пам'яті, а також зорової і асоціативної пам'яті. При цьому роль когнітивних і емоційно-особистісних порушень особливо велика на ранніх стадіях хвороби при відсутності вираженої неврологічної симптоматики [13, 84]. Зв'язок когнітивних порушень з активністю патологічного процесу при РС [12] побічно підтверджується лабільністю нейропсихологічних параметрів на тлі теплової проби [195], а також регресом когнітивної дисфункції під впливом патогенетичної терапії [256]. Крім того, патопсихологічні зміни, що виникли при загостренні РС, можуть бути оборотними, особливо у хворих у

початковій стадії захворювання [216]. Є й зворотний зв'язок: показано достовірне вплив на частоту загострень РС психоемоційних стресів [223]. Відзначено, що приблизно половина пацієнтів, які страждають на РС, не мають ознак інтелектуальних проблем, у 40% має місце легка і у 10% - помірна когнітивна дисфункція [310, 311].

Нами встановлено, що погіршення мнестичних процесів, як свідчення когнітивного дефіциту на тлі перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, супроводжувалося проявами гіперактивації процесів вільнорадикального окислення ліпідів і білків та суттєвим пригніченням системи антиоксидантного захисту як у неокортексі, так і у гіпокампі. Імовірно, пригнічення СОД, ГПО, ГР пов'язане з неферментативною інактивацією цих ферментів, а також блокадою їх SH-груп АФК [3, 19]. Отримані дані погоджуються з результатами інших дослідників і свідчать про істотний внесок аутоімунних і нейродегенеративних порушень у розвитку оксидативного стресу і дисфункції клітин (нейрони і гліальні клітини) головного мозку [34, 162, 203, 221, 254]. Тому наявність та виразність антиоксидантних властивостей може відігравати певну роль у нейропротекторному потенціалі досліджуваних засобів.

Відомо, що за умов оксидативного стресу, мітохондрії пошкоджуються одними з перших. Результатом цього є зниження процесів окислювального фосфорилування та синтезу АТФ. Крім цього, супероксид і пероксинітрит, які утворюються в «паразитарних» реакціях на початковій ділянці ДЛМ, ініціюють розвиток стійкої мітохондріальної дисфункції з подальшим енергодефіцитом нейрона [22]. В цілому виникає замкнуте коло, коли брак кисню порушує енергообмін і стимулює утворення АФК, які ушкоджують мембрани мітохондрій і лізосом, що може призвести до мітохондріальної дисфункції.

Нами доведено, що експериментальний алергічний енцефаломієліт викликав збільшення швидкості відкривання мітохондріальної пори в 9,1

рази ($p < 0,05$) і падіння потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій на 78% ($p < 0,05$), що свідчить про розвиток мітохондріальної дисфункції. Ініціалізація відкривання неспецифічної Ca^{2+} -залежної пори являється ключовим фактором запуску реакцій апоптоза і некрозу клітин [9].

Отримані нами дані погоджуються з результатами раніше проведених експериментальних досліджень, згідно яких нейродегенеративні захворювання ініціюють мітохондріальну дисфункцію, зниження вмісту АТФ та співвідношення АТФ/АДФ в синаптосомах головного мозку [82, 96, 193, 267]. Адже відомо, що нейрони головного мозку потребують значного і постійного енергетичного забезпечення у порівнянні з іншими клітинами організму. При цьому основним джерелом енергії у мозку є АТФ та креатинінфосфат, а субстратом – глюкоза.

Експериментально встановлено, що перебіг експериментального алергічного енцефаломієліту призводив до зниження рівнів макроергічних фосфатів, порушень вуглеводного обміну і енергозабезпечення нейронів кори головного мозку, ознаками яких було гальмування компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів вироблення енергії, зокрема, малат-аспатажного шунта, що виражалось в зменшенні рівня малату на 51% ($p < 0,05$) і аспартату на 40% ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин. При цьому реєструвалася активація анаеробного гліколізу (підвищення співвідношення лактат/піруват) та розвиток енергетичного дефіциту (зменшення вмісту АТФ на 42% ($p < 0,05$), АДФ – на 43% ($p < 0,05$) на тлі зростання пулу АМФ на 82% ($p < 0,05$).

Очевидно, при нейродеструкції як ішемічної, так і запальної природи, NO (макрофагальний або екзогенний) пригнічує окислювальне фосфорилування у мітохондріях клітин-мішеней за рахунок оборотного зв'язування з цитохром С-оксидазою мітохондрії. Пригнічення електронного транспорту в мітохондрії призводить до генерації супероксиду і, як наслідок, утворенню ONOO^- . Синтез пероксинітриду спостерігається в клітинах з високою активністю NO-синтази та ферментів, які продукують АФК

(ксантиноксидаза, НАДН-оксиредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа, ферменти електронно-транспортного ланцюга). Останніми дослідженнями встановлено, що на початкових стадіях ішемії рівень пероксинітриту може знижуватися за посередництвом мітохондріальної нітроредуктази, яка відновлює його за допомогою НАДФН і НАДН у NO. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до зниження заряду мітохондрій, що може ініціювати апоптичний процес. Відкривання пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» в «топку» субстратів окислення без утворення АТФ. Крім того, пошкоджені мітохондрії перетворюються в джерело АФК і проапоптичних факторів. Виснаження компенсаторних можливостей системи енергозабезпечення, пов'язане з мітохондріальною дисфункцією, може переключати орган на енергодефіцитний баланс, ці явища обмежують функціональні можливості нейронів і можуть сприяти розвитку патологічних реакцій, які в подальшому ведуть до ініціації апоптозу незворотного ушкодження та загибелі нейрона [186]. На початку індукції цього каскаду розвиваються функціональні, а в подальшому і незворотні морфологічні зміни у головному мозку.

Проведеними нами дослідженнями морфометричних показників стану сенсомоторної зони кори головного мозку встановлено, що перебіг ЕАЕ призводив до зменшення щільності нейронів, розвитку явищ набряку їх тіл, пригнічення біосинтетичних реакцій та активації процесів апоптозу. Так, експериментально визначено, що за умов експериментального алергічного енцефаломієліту 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, було зареєстроване зниження транскрипційних процесів в нейронах сенсомоторної кори, про що свідчило зниження рівня РНК на 21% ($p < 0,05$). До того ж, у неокортексі тварин з експериментальною патологією спостерігалось підвищення щільності апоптичних та деструктивних клітин на 150% ($p < 0,05$). При цьому частка

апоптичних клітин в зазначеній структурі головного мозку зросла практично в 5 разів ($p < 0,05$).

Аналізом результатів дослідження ультраструктурних характеристик гіпокампу встановлено, що в групі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом апоптоз в нейронах відбувався переважно за мітохондріальним типом, причому більшість нейронів знаходилась на початкових стадіях апоптотичних процесів. Нами зареєстроване крупнодисперсне пошкодження нуклеоплазми нейронів з частково збереженою активністю ядра. В нейронах гіпокампу даної експериментальної групи небагато лізосом, а порушення гранулярного ретикулуму у перикарионі проявлялися набуханням і утворенням вакуолеподібних цистерн. Індукція ЕАЕ викликала руйнування крист, часткову дефрагментацію зовнішніх мембран частини мітохондріального апарату клітин.

Отримані нами результати розширюють можливості морфологічної діагностики розсіяного склерозу та доповнюють дані досліджень, які свідчать, що патоморфологічні зміни при РС проявляються наявністю розсіяних бляшок з різною стадією розвитку в головному і спинному мозку; вогнищевим розпадом мієліну, оголенням осьового циліндра на тлі помірного набряку і гіперемії нервової тканини, очищенням дефекту від продуктів розпаду мієліну гліальними та плазматичними клітинами з послідовним склерозуванням дефекту мієлінової оболонки за рахунок проліферації гліальних елементів – астроцитів і гістіоцитів [24, 53, 109, 320].

Отже, у ході експерименту показана ефективність моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту у білих нелінійних щурів, а також відповідність моделі хронічному проградієнтному перебігу РС у людини за сукупністю клінічних проявів, гістологічних, імунних і біохімічних змін [25, 45, 47, 107, 186].

Метою наступного етапу чинного дослідження було експериментальне обґрунтування шляхів фармакологічної корекції больового синдрому за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Відомо, що ноцицептивні болі при РС пов'язані з порушенням м'язової сили, патологічними позами, неправильним руховим стереотипом, довготривалою іммобілізацією, а також з розвитком артрозів та остеопорозу [6, 287]. В терапії ноцицептивних больових синдромів активно застосовують нестероїдні протизапальні препарати, з метою зменшення побічних ефектів яких (ульцерогенна дія, підвищення рівня глікемії тощо) рекомендовано, насамперед, використання селективних блокторів циклооксигенази 2 типу (мелоксикам, теноксикам) [5, 7, 8, 43, 110].

Як свідчать результати, отримані нами, за умов одноразової підшкірної інюкуляції енцефалітогенної суміші в повному ад'юванті Фрейнда у тварин контрольної групи розвивалося зниження порогу ноцицептивної відповіді на електричне подразнення хвоста на 41,5% ($p < 0,05$) в порівнянні з інтактними гризунами. Цілковімовірно, що гіпералгезія на ранніх етапах розвитку ЕАЕ пояснювалася зростанням активності PGH-синтази у 2,8 рази ($p < 0,05$) та у 2,6 рази ($p < 0,05$) у головному та спинному мозку відповідно, що викликало збільшення рівня прозапальних похідних арахідонової кислоти, які сприяють зниженню порогу ноцицепції.

Порівняльним аналізом показників болезаспокійливої активності комбінацій метилпреднізолону з анальгетиками за умов сформованого ЕАЕ показано, що їх антиноцицептивний потенціал (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) зменшувався в ряду мелоксикам > лорноксикам $\approx$ кеторолак $\approx$ парацетамол > целекоксиб $\approx$ диклофенак натрію > ібупрофен. Відповідно, максимальний вплив на поріг ноцицепції за даних умов експерименту чинили мелоксикам та лорноксикам. Зокрема, при застосуванні мелоксикаму пік анальгетичної активності препарату, зафіксований на 90 хвилині після введення, проявлявся підвищенням порогу болі майже в 4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з групою активного контролю (експериментальний

алергічний енцефаломієліт). Знеболюючий вплив лорноксикаму дещо поступався болетамуючій дії мелоксикаму: збільшення больового порогу, обумовлене препаратом, на 252,6% ($p < 0,05$) перевищувало відповідний показник тварин контрольної групи.

Водночас встановлено, що антиноцицептивний потенціал використаних засобів безпосередньо корелював із змінами активності PGH-синтази головного і спинного мозку експериментальних тварин з модельованою патологією, що свідчить про взаємозв'язок між ступенем інактивації зазначеного ферменту та терапевтичною активністю цих засобів. Так, комбіноване введення метилпреднізолону з диклофенаком натрію, целекоксибом та мелоксикамом сприяло зниженню активності PGH-синтази в структурах головного мозку на 49,8% ($p < 0,05$), 50,4% ($p < 0,05$) та 51% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками групи контролю. Ці ж засоби виражено знижували активність PGH-синтази і в спинному мозку на 23,9% ($p < 0,05$) (М + диклофенак), на 34% ($p < 0,05$) (М + целекоксиб) та на 47,4% ($p < 0,05$) (М + мелоксикам) у порівнянні з показниками групи контролю. Ми вважаємо, що терапевтична ефективність досліджених НПЗЗ за умов експериментального алергічного енцефаломієліту, в першу чергу, опосередковується їх впливом на активність PGH-синтази та, відповідно, рівень продукції PGD_2 , який є найбільш поширеним простагландином головного мозку, але існує протягом короткого періоду часу і піддається дегідратації з утворенням біологічно активних простагландинів серії J_2 , зокрема, 15-дезоксипростагландину J_2 (15d-PG J_2). Цей простагландин є природним хімічно стійким протизапальним похідним PGD_2 з вираженою антифлогістичною дією, який може сприяти корекції нейродегенеративних порушень при хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона, а також розсіяному склерозі [99].

Доведено, що в серед представників НПЗЗ (диклофенак натрію, целекоксиб, мелоксикам, лорноксикам та ібупрофен) максимальну терапевтичну ефективність виявляв мелоксикам, котрий (з урахуванням

базової терапії метилпреднізолоном) характеризувався високим рівнем болетамуючої дії та статистично значимо знижував активність PGH-синтази в головному та спинному мозку у порівнянні з показниками групи ЕАЕ.

З метою поглиблення фармакологічного аналізу отриманих експериментальних даних із знеболюючої активності нестероїдних протизапальних засобів та даних активності PGH-синтетази за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні використання глюкокортикостероїду нами був проведений кореляційний аналіз результатів.

Встановлено, що антиноцицептивний потенціал використаних засобів безпосередньо корелював із змінами активності PGH-синтази головного і спинного мозку експериментальних тварин з модельованою патологією, що свідчить про взаємозв'язок між ступенем інактивації зазначеного ферменту та терапевтичною активністю цих засобів.

Для оцінки знеболюючої активності проводили кількісне визначення показників порогу больової чутливості (В) від електростимулятора ЕСЛ-1. Оцінку активності PGH – синтетази вимірювали у мкмоль/хв/мг білка. При проведенні кореляційного аналізу застосований метод параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Від'ємне значення коефіцієнта вказує на зворотній (негативний, від'ємний) зв'язок між досліджуваними явищами, додатне – на прямо пропорційний (прямий, позитивний) зв'язок, а нульове значення – на його відсутність. За силою зв'язку кореляційну залежність вважали тісною (сильною) при $|r|=0,70-0,99$, середньою – при $|r|=0,30-0,69$, слабкою – при $|r|=0,01-0,29$. Значимість коефіцієнта кореляції оцінювали за допомогою критерію Ст'юдента за вірогідності похибки $p<0,05$.

Дані кореляційного аналізу вказують на залежність змін антиноцицептивного потенціалу та динаміки змін рівня активності PGH-синтетази у головному мозку щурів з ЕАЕ під впливом НПЗЛЗ на фоні дії

метилпреднізолону. Згідно отриманих даних ми виявили, що існує пряма залежність між знеболюючою активністю та рівнів зміни активності ферменту у лорноксикаму (+0,28), диклофенаку натрію (+0,43) та метилпреднізолону (+0,35). Це означає, що знеболююча активність препаратів за умов сформованого ЕАЕ не пригнічує активність PGH-синтетази. Високоселективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб має досить слабкий зв'язок з пригніченням активності ферменту (+0,08). Досліджуваний препарат мелоксикам мав тісний негативний зв'язок між досліджуваними явищами (-0,78).

Отримані нами статистичні дані підтверджують експериментальні дані щодо спектру антиноцицептивної активності за умов демієлінізуючої патології на фоні базової гормонотерапії, які свідчать про те, що для медикаментозної корекції больового синдрому доцільно рекомендувати мелоксикам, який виявляв високий рівень болетамуючої дії та достовірно значимо знижував активність PGH-синтази в головному та спинному мозку.

Проведеним нами аналізом анальгетичної активності антидепресантів та антиконвульсантів як засобів корекції ноцицептивного болю за умов ЕАЕ встановлено, що їх антиноцицептивний потенціал поступався виразності знеболюючої дії НПЗЗ. Так, за даних умов експерименту максимальна анальгетична активність реєструвалася у флуоксетину і тритіко або ж прегабаліну і габапентину, що відповідало збільшенню порогу болі при їх введенні в середньому в 2,5 рази ($p \leq 0,05$). До того ж, застосування як антиконвульсантів, так і антидепресантів не було спроможним повністю нормалізувати поведінкові реакції та відновити м'язову силу експериментальних щурів, порушених індукцією ЕАЕ.

Отже, в ряду досліджених НПЗЗ, антидепресантів та антиконвульсантів максимальну терапевтичну ефективність як засіб корекції ноцицептивного болю за умов ЕАЕ на фоні базової терапії метилпреднізолоном виявляв мелоксикам, що дає підстави рекомендувати

саме його в якості анальгетика вибору для усунення соматичних больових синдромів при розсіяному склерозі.

Водночас, як свідчать результати проведених нами досліджень, антиконвульсанти та антидепресанти виявили високу терапевтичну ефективність в терапії невропатичних больових синдромів, викликаних індукцією ЕАЕ.

Нами показано, що підшкірна інюкуляція енцефалітогенної суміші у тварин експериментальних груп викликала статистично значиме зниження порогу тактильної чутливості в 2,3 рази ($p < 0,001$) по відношенню до інтактного контролю. При цьому ін'єкція 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи щурів призводило до статистично значимого збільшення загальної кількості здригувань в 9,5 рази ($p < 0,001$). До того ж, у тесті «гаряча пластина» у щурів з ЕАЕ-індукованою невропатією латентний період реакції уникнення статистично значимо знижувався в 1,7 рази ($p < 0,05$) по відношенню до групи інтактного контролю, що свідчило про розвиток нейрональної сенситизації, алодинії і гіпералгезії. Як зазначається рядом авторів, розвиток стимулзалежного болю, який виникає у відповідь на подразнення сенсibiliзованих в результаті пошкодження периферичних ноцицепторів, опосередковується механізмами, обумовленими порушенням процесів гальмування на рівні заднього рогу [115]. Внаслідок збільшення збудливості чутливих нейронів задніх рогів спинного мозку, пов'язаних із зоною іннервації пошкодженого нерва, відбувається сенсibiliзація прилеглих інтактних нейронів з розширенням рецептивної зони [115]. Сенсibiliзація нейронів задніх рогів приводить до зниження больового порогу і розвитку алодинії, тобто появи больових відчуттів на подразнення, яке в нормі ними не супроводжується [115].

Як свідчать результати, отримані нами, після курсового введення протисудомних засобів або ж антидепресантів при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки реєструвалося підвищення порогу тактильної чутливості. 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%, $p > 0,05$). При цьому статистично значиме підвищення порогу алодинії по відношенню до показників активного контролю під впливом антидепресантів реєструвалося тільки у тварин, яким вводили амітриптилін і тразодон (-60%, $p < 0,05$ і -40%, $p < 0,05$ відповідно).

Показано, що після курсового введення антиконвульсантів та антидепресантів загальна кількість здригувань, що викликаються ін'єкцією 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи ЕАЕ-асоційованих щурів, було меншим, ніж у групі контролю. Так, кількість відповідей ранньої і пізньої фази під впливом габапентину і прегабаліну, а також амітриптиліну статистично значимо зменшувалася в середньому на 43% ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин контрольної групи. Крім того, продемонстровано, що за умов курсового введення всіх досліджених антиконвульсантів реєструвалося статистично значиме збільшення латентного періоду реакції облизування лапок в середньому на 52% ($p < 0,05$). Отримані дані погоджуються з результатами інших дослідників, зокрема, з даними Барінова Н.А. (2007), згідно яким специфічні теплові TRPV-3 і TRPV-4 терморецептори A_{δ} -афферентів (проводять невольову імпульсацію) активуються в нормі при більш низькій температурі, ніж TRPV-1 і TRPV-2 рецептори C-афферентів (проводять больову імпульсацію), і пригнічують проведення ноцицептивної аферентації на центральному рівні. Пошкодження A_{δ} -афферентів при невропатії приводить до втрати гальмівних впливів на спинальному рівні та зміні теплового больового порогу. Таким чином, біль виникає у зв'язку з подразненням TRPV-1 рецепторів при більш низькій, ніж в нормі, температурі внаслідок порушення центрального гальмування [115]. Ймовірно, курсове введення антиконвульсантів і амітриптиліну сприяло відновленню структурної організації мієлінізованих A_{δ} -афферентів, пов'язаних з ваніллоїдними терморецепторами TRPV-4 і TRPV-3, нормалізуючи

гальмівні впливи на спинальному рівні і викликаючи центральну модифікацію полімодального сенсорного імпульсу.

Максимальна вираженість терапевтичного ефекту габапентину і прегабаліну пояснюється, очевидно, 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 [5, 7, 42]. До того ж, антиноцицептивні ефекти зазначених препаратів можуть обумовлюватися гальмуванням вивільнення збуджуючих амінокислот з пресинаптичних закінчень [2], оскільки при більшості клінічних форм невропатичного болю канали NMDA-рецепторів повністю відкриті, що сприяє кальцієвому інфлюксу, підвищенню нейрональної збудливості та генної експресії, внаслідок чого розвивається нейрональна сенситизація, аллодинія і гіпералгезія [115].

Антиконвульсанти традиційно використовуються в терапії невропатичного болю. Вперше звіт про анальгетичний ефект протисудомного препарату фенітоїн був опублікований в 1942 році. Натепер основним препаратом для лікування невралгії трійчастого нерва при розсіяному склерозі або його ідіопатичній невралгії є карбамазепін (фінлепсин, тегретол). Поряд з ним, пропонують призначати інші антиконвульсанти, такі як ламотриджин [37], вальпроєву кислоту, бромокриптин [26]. Особливий інтерес представляє можливість використання атипичного антиконвульсанта габапентин, який є жиророзчинною амінокислотою, за хімічною будовою схожою з ГАМК, що є основним гальмівним медіатором-нейротрансмітером, який бере участь у передачі та модуляції болю. Завдяки його впливу, знижується гіперзбудливість клітинних мембран, зменшується сенситизація ноцицептивних нейронів, збільшується синтез ГАМК, яке сприяє підвищенню активності антиноцицептивної системи. До того ж, інгібування синтезу збудливого нейромедіатора глутамата призводить до зниження збудливості структур ноцицептивної системи та запобігання загибелі

нейронів, а модуляція активності NMDA – рецепторів дозволяє впливати на процеси формування «больової пам'яті» [2].

Ще одним з напрямків терапії невропатичних больових синдромів є застосування психотропних препаратів, модулюючих опіюїдні 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 нортриптиліну мають найбільшу доказову базу при терапії невропатичних больових синдромів [234]: доведена дозозалежна болезаспокійлива дія саме трициклічних антидепресантів щодо аллодинії, 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 [110, 157, 210].

Вважається, що антиноцицептивні властивості антидепресантів більш виражені у препаратів, що впливають на як серотонінергічну, так і норадренергічну нейромедіаторні системи [95], що підтверджують результати нашого дослідження.

Отже, в ряду досліджених антидепресантів та антиконвульсантів максимальну терапевтичну ефективність як засоби корекції невропатичного болю за умов ЕАЕ на фоні базової терапії метилпреднізолоном виявляли габапентин, прегабалін та амітриптилін, що дає підстави рекомендувати їх в якості ад'ювантних анальгетиків для усунення невропатичних больових синдромів при розсіяному склерозі. Водночас необхідно враховувати, що навіть сучасні антиконвульсанти не виявляють достатньою специфічністю для блокування передачі тільки ноцицептивного сигналу, і як наслідок, викликають ряд побічних ефектів, зокрема, можуть посилювати симптоми слабості і атаксії у хворих на розсіяний склероз [7, 42, 95].

Натеper в патогенезі розсіяного склерозу добре вивчена роль окислювального стресу та зниження активності антиоксидантного захисту [3, 19, 20, 28, 32, 34, 52, 68, 78]. Головний мозок містить найбільші резерви фосфоліпідів – основного субстрату перекисного окислення і особливо чутливий до гіперпродукції вільних радикалів, так як усі фактори їх нейтралізації в основному знаходяться у крові і за умов ішемії не досягають клітин мозку. Вільні радикали, які у великій кількості утворюються у вогнищах аутоімунного запалення активованими макрофагами і мікроглією, призводять до пошкодження клітинних мембран і ДНК олігодендроцитів та нейронів з розвитком демієлінізації і руйнуванням аксонів [28]. У фізіологічних умовах шкідливу дію вільних радикалів стримують ендогенні субстанції, зокрема, каталаза, глутатіонпероксидаза, супероксиддисмутаза, токоферол, відновлений глутатіон. Підвищена чутливість нейронів головного мозку до окислювального стресу може бути наслідком низького вмісту ферментів антиоксидантного захисту, високого рівня поліненасичених жирних кислот, іонів двовалентного заліза, що вивільняються при пошкодженні клітин. У хворих на РС виявляють істотне зниження вмісту і активності чинників антиоксидантного захисту та явні ознаки окисного стресу [60, 69, 85]. Це є передумовою для цілеспрямованого використання антиоксидантних препаратів в комплексному лікуванні розсіяного склерозу.

Як свідчать отримані нами результати наступної серії досліджень, перебіг реакцій вільно-радикального окислення ліпідів та білків, які активізувалися при ЕАЕ та впливали на розвиток його ускладнень, найбільш виражено гальмувався за умов комбінованого застосування метилпреднізолону (як засобу базової гормональної терапії) та антиконвульсантів. Зокрема, вони статистично значимо зменшували рівень МДА в корі великих півкуль та стовбурі головного мозку. При цьому максимальне зниження вмісту МДА відмічалось у неокортексі під впливом габапентину (- 67%, $p < 0,05$) та прегабаліну (-68%, $p < 0,05$). В меншій мірі, однак статистично значимо, зменшення цього показника відмічалось також

після введення топірамату, вальпроату натрію та карбамазепіну (від 1,91 до 2,53 рази).

Вплив комбінованого введення метилпреднізолону та антиконвульсантів на стан системи антиоксидантного захисту характеризувалася відновленням активності СОД у неокортексі при використанні, в першу чергу, протисудомних «ГАМК-подібних» засобів – габапентину та прегабаліну. За ступенем впливу на цей показник препарати розмістилися наступним чином: прегабалін (в 7 разів, $p < 0,05$) > габапентин (в 5,5 разів, $p < 0,05$) $\geq$ карбамазепін (в 5 разів, $p < 0,05$) > вальпроат натрію (в 3,5 рази, $p < 0,05$) $\geq$ топірамат (в 3 рази, $p < 0,05$). Водночас застосування лише метилпреднізолону як засобу базової гормональної терапії сприяло тільки помірному підвищенню активності СОД (+ 146%, $p > 0,05$).

Водночас нами доведена терапевтична ефективність представника «класичних» антиоксидантних засобів – альфа-ліпоєвої кислоти за умов експериментально індукованого еквівалента розсіяного склерозу. Так, сумісне її застосування з метилпреднізолоном повністю запобігало розвитку патології у 25% тварин та суттєво послаблювало тяжкість і тривалість ЕАЕ у решти гризунів (клінічний індекс на піку патології зменшувався на 19%, кумулятивний - на 17%, а тривалість ЕАЕ - в 1,3 рази в порівнянні з групою, що одержувала метилпреднізолон).

Встановлено, що препарат чинив позитивний вплив на процеси введення інформації і попереджав прискорене згасання набутого умовного навику в умовах експериментальної патології. Найбільш виражений вплив альфа-ліпоєва кислота виявляла при тривалому застосуванні, що проявлялося збільшенням коефіцієнта антиамнестичної активності (75% на 12 добу і 81% на 20 добу дослідження) та тенденцією до підвищення кількості тварин зі збереженим умовним рефлексом на 20 день спостережень.

Крім того, показано, що поєднане застосування антиоксиданту альфа-ліпоєвої кислоти і метилпреднізолону сприяло посиленню горизонтальної рухової активності дослідних тварин у 1,56 рази ($p < 0,05$). При цьому

спостерігалось зростання на 100% ($p < 0,05$) кількості підйомів на задні лапи та збільшення на 73,9% ($p < 0,05$) числа проявів «норкового» рефлексу.

Імовірно, позитивна динаміка поведінкових реакцій гризунів під впливом метилпреднізолону пояснюється нормалізацією порушень в гематоенцефалічному бар'єрі, які розвиваються при ЕАЕ внаслідок інгібування протизапальних цитокінів та пришвидшення апоптозу імунних клітин. Оскільки олігодендроцити мають кортикостероїдні рецептори, кортикостероїди можуть також сприяти поділу олігодендроцитів і ремієлінізації аксонів [115].

Припускаємо, що терапевтична дія α -ліпоєвої кислоти при ЕАЕ реалізувалася за рахунок її антиоксидантних властивостей, що пов'язано з наявністю в структурі препарату тіолових груп, а також через каскад «цАМФ/протеїнкіназа А», що супроводжується зниженням рівня прозапальних цитокінів, інтерлейкіна-1 та гамма-інтерферона. При цьому α -ліпоат, можливо, гальмував експресію адгезивних молекул, збільшував внутрішньоклітинний пул глутатіону [188] та виявляв антирадикальну дію – видаляв активні гідроксильні радикали, гіпохлорну кислоту, оксид азоту, пероксінітрит, перекис водню та атомарний кисень [203]. Включення в антиоксидантний комплекс ліпоєвої кислоти при лікуванні хворих на РС засновано, крім того, на її здатності легко долати ГЕБ, що дозволяє здійснювати нейропротекцію в ЦНС [32].

Доцільність нейропротекторної терапії за умов ЕАЕ нами підтверджена результатами наступного етапу досліджень на прикладі комбінованого застосування з метилпреднізолоном цитиколіну.

Натепер нейропротекція все частіше розглядається перспективним напрямом терапії розсіяного склерозу, яка визначається як захист нейронів і глії від ушкодження, яке викликається екзо- або ендогенними шкідливими агентами чи процесами [21]. 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 [70, 163]. Враховуючи сучасні стандарти нейропротекції при розсіяному склерозі, а також фармако-економічні показники (співвідношення вартість/ефективність), натеper оптимальну нейропротективну терапію захворювання з позицій практичної неврології проводять із залученням засобів протизапальної терапії, препаратів протидії апоптозу нейронів та олігодендроцитів, засобів гальмування глутаматної ексайтотоксичності, антиоксидантної та ремієлінізуючої терапії [163].

Показано, що застосування цитиколіну з другого по 16 день після інюкуляції ЕГС на тлі терапії метилпреднізолоном попереджало розвиток ЕАЕ у 37,5% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ до 12,5 % випадків спостережень. У порівнянні з моно введенням глюкокортикоїду, поєднане застосування цитиколіну і метилпреднізолону сильніше зменшувало виразність неврологічних порушень. Зокрема, в даній серії досліджень на 38% знижувався клінічний індекс на піку ЕАЕ, на 30% - кумулятивний індекс захворювання, а також вкорочувалася тривалість ЕАЕ з 8,4 до 5 днів у порівнянні з групою, що одержувала базову гормональну терапію.

Високий ноотропний потенціал цитиколіну у щурів з ЕАЕ підтверджувала виразна антиамнестична активність препарату, яка характеризувалася зростанням показника $K_{\Delta a}$. При цьому цитиколін сприяв збільшенню латентного періоду пасивно-оборонного навику, перевершуючи на 12 і 20 добу тестування на 49% ($p < 0,05$) і 63% ($p < 0,05$) відповідно даний показник групи активного контролю. Нами зазначено, що препарат також зменшував дефіцит просторової пам'яті: під впливом цитиколіну значення $K_{\text{ПВВ}}$ у тварин з втраченою навиком в умовах експериментальної демієлінізуючої патології ЦНС достовірно збільшувалося в 5 разів ($p < 0,05$).

Характерно, що цитиколін статистично значимо знижував прояви мітохондріальної дисфункції. Оптимізація процесів окислювального

фосфорилування у мітохондріях за умов введення препарату, сприяла відновленню енергозабезпечення, зокрема, зростанню рівнів АТФ та АДФ на тлі зменшення вмісту АМФ. При цьому встановлено, що цитиколін запобігав зниженню швидкості процесів мітохондріального дихання, підвищують рівень «заповнення» системи АТФ-АДФ-АМФ високоенергетичними фосфатними зв'язками, сприяв активізації процесів утворення АТФ із АДФ, коригуючи співвідношення окремо взятих макроергічних фосфатів та інтенсивність реакцій фосфорилування.

Одним з найбільш вагомих параметрів є рівень доступної енергії, зарезервованої в аденіловій системі, а саме енергетичний заряд. Він дозволяє адекватно оцінювати стан процесів синтезу та використання АТФ. Нами доведено, що цитиколін сприяв зростанню цього показника у неокортексі щурів з ЕАЕ: введення комбінації метилпреднізолону і цитиколіну призводило до достовірного зниження швидкості відкриття мітохондріальної пори на 66 % ($p < 0,05$) і підвищенню заряду внутрішньої мембрани мітохондрії на 69% ($p < 0,05$).

Передумовами значної метаботропної активності цитиколіну, можливо, є стимуляція реакцій аеробного гліколізу, оптимізація процесів аеробного метаболізму пірувату у циклі Кребса, активізація функціонування малат-аспартатного човникового механізму завдяки зростанню рівнів аспартату, який приймає участь у функціонуванні «малат-аспартатного» шунта, залучається до циклу трикарбонових кислот і сприяє зростанню синтезу макроергів [113]. Слід зазначити, що процеси аеробного метаболізму ПВК у циклі трикарбонових кислот у мозковій тканині пов'язані з піруватдегідрогеназною реакцією, яка дає початок для біосинтезу ацетилхоліну – одного з ключових нейромедіторів, який відіграє значиму роль у когнітивних функціях [12, 13, 184].

Отже, згідно проведеного аналізу можна припустити, що за умов експериментально відтвореного алергічного енцефаломієліту цитиколін бере участь у біосинтезі мембранних фосфоліпідів нейронів, в першу чергу,

фосфатидилхоліну (лецитину). Фосфоліпіди формують структурно-функціональну основу нейрональних мембран, які забезпечують діяльність нервових клітин і мозку в цілому (підтримання іонного балансу і активності мембранних ферментів, забезпечення проведення нервового імпульсу тощо). Цитиколін при екзогенному введенні швидко гідролізується в організмі на циркулюючі цитидин і холін, з яких після всмоктування в системний кровотік ресинтезується ЦДФ-холін. Основним механізмом дії цитиколіну, що визначає його нейропротекторні властивості, є забезпечення збереження зовнішніх і внутрішніх (цитоплазматичних та мітохондріальних) нейрональних мембран, насамперед, шляхом ослаблення активності фосфоліпази A_2 , активації нейрональних мітохондріальних цитохромоксидаз та інгібування глутамат-індукованого апоптозу [115]. 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 [17, 21, 22, 101, 104, 178].

Незаперечним підтвердженням нейропротективного ефекту сумісного введення метилпреднізолону з цитиколіном є результати аналізу їх впливу на гістоморфометричні показники нейронів кори головного мозку та ультраструктурну організацію неокортексу та гіпокампа у тварин з ЕАЕ. Визначено, що цитиколін покращує морфо-функціональний стан нейронів, глії і синаптичного апарату у цих мозкових утвореннях, що сприяє активації механізмів адаптації і запобігає процесам ушкодження нейроцитів та їх подальшому апоптозу. 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% ($p < 0,05$). При цьому ультрамікроскопічні дослідження кори фронтальної долі та гіпокампа головного мозку щурів при введенні метилпреднізолону та цитиколіну за умов ЕАЕ продемонстрували зниження ступеню набряку цитоплазми олігодендроцитів; зменшення обсягу патологічних змін в мітохондріях; відновлення електронної щільності цитоплазми та кількості рибосом до норми; нормалізацію структурної організації ядер нейронів, які можуть розцінюватись як маркери компенсаторної дії цитиколіну на нейрони за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу.

З метою поглиблення фармакологічного аналізу отриманих експериментальних даних із нейропротекторної активності препарату-лідера цитиколіну за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні використання метилпреднізолону нами був проведений кореляційно-регресійний аналіз результатів.

На щільність нейроцитів впливають наступні фактори: площа нейронів, вміст РНК, доля апоптичних клітин, щільність апоптичних і деструктивних клітин, швидкість відкриття мітохондріальної пори, потенціал мембрани мітохондрії, показники енергетичного обміну (рівні АТФ, АДФ та АМФ), лактат, малат, аспартат, піруват, ізоцитрат та вплив цитиколіну на латентний період УРПУ на 12 добу.

Нами було виявлено різний ступінь впливу прямої залежності. Так високий вплив (+0,8615) на щільність нейронів справляв потенціал мембрани мітохондрії. Менш вагомим фактором була щільність апоптичних і деструктивних клітин (+0,5770) (рис. 7.1).

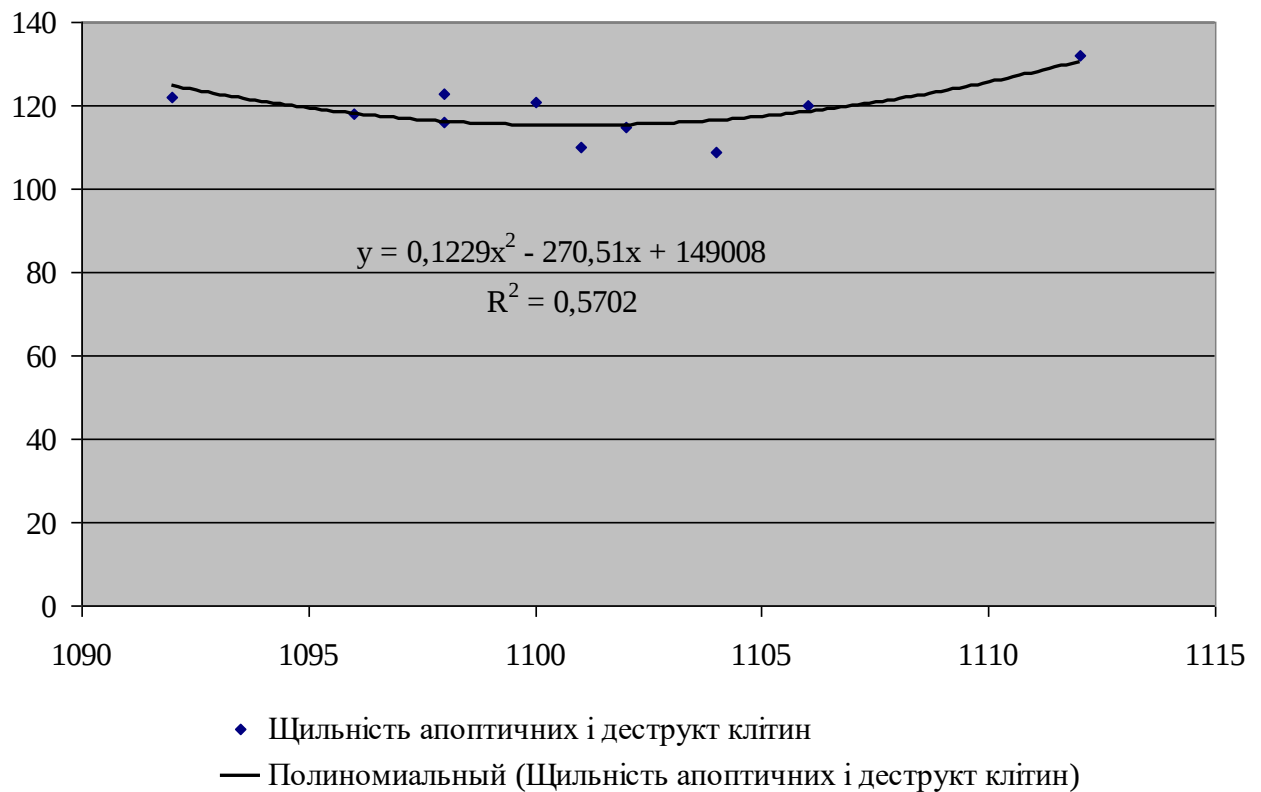


Рис. 7.1. Вплив щільності апоптичних і деструктивних клітин на щільність нейроцитів

Слабкий вплив щодо щільності клітин було виявлено з боку результатів латентного періоду УРПУ на 12 добу (+0,1249).

За результатами кореляційно-регресійного аналізу було встановлено, що інших залежностей не було виявлено. Такий аналіз дав змогу відкинути ті фактори, які мають незначний вплив на результуючу величину.

Слід зазначити, що в терапії хронічних захворювань, в т.ч. розсіяного склерозу, передбачається використання лікарських засобів з різних фармакологічних груп, що сприяє розвитку фармацевтичної поліпрагмації. З практичної точки зору, перспективним видається комбіноване використання препаратів, фармакологічні ефекти яких є однонаправленими, але розвиваються за рахунок різних фізіологічних механізмів або шляхом впливу на різні стадії патологічного процесу. Тому на заключному етапі наших досліджень нами проведено комп'ютерне прогнозування можливості

комбінованого використання метилпреднізолону (як основного засобу базової терапії РС) та цитиколіну за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Прогнозуванням фармакологічної взаємодії зазначених компонентів показано, що вона може розвиватися на рівні зміни фармакокінетики інгредієнтів і їх фармакодинаміки (вплив на суміжні або однакові рецепторні системи, потенціювання або зменшення фармакологічної відповіді через функціонального антагонізму тощо). Доведено, що в представленій комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Крім того, від спільного застосування метилпреднізолону з цитиколіном слід очікувати посилення його стимулюючої дії. 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.

Таким чином, експериментальний алергічний енцефаломієліт, індукований у нелінійних білих щурів, є найбільш адекватною моделлю розсіяного склерозу й супроводжується цілим рядом змін запального характеру із залученням у патологічний процес практично всіх систем регуляції гомеостазу організму. Виявлені та встановлені закономірності фармакологічної активності досліджених тест-зразків за умов ЕАЕ є передумовою вибору оптимального препарату або ж комбінації засобів для забезпечення адекватної та повноцінної фармакологічної корекції больового синдрому та медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведений порівняльний системний аналіз нейротропної активності класичних та ад'ювантних анальгетиків і засобів медикаментозного захисту мозку, а також наведено експериментально-теоретичне обґрунтування шляхів оптимізації терапевтичних стратегій больового синдрому за умов ЕАЕ з акцентом на терапію нейродегенеративних порушень когнітивних функцій при розсіяному склерозі.

1. За умов демієлінізуючої патології на фоні базової гормонотерапії мелоксикам виявляє максимально виражений рівень болетамуючої дії, підвищуючи больовий поріг майже в 4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ЕАЕ та достовірно значимо знижуючи активність РGH-синтази в головному (- 51%, $p < 0,05$) та спинному (- 47,4%, $p < 0,05$) мозку.

2. Для корекції як хронічного, так і невропатичного больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном в ряду ад'ювантних анальгетиків доцільно рекомендувати антиконвульсант габапентин, який виявляє виражену знеболюючу активність за умов модельованої патології, збільшуючи поріг ноцицепції в 2,5 рази ($p \leq 0,05$).

3. Застосування лікарських засобів з нейропротективною активністю здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ. 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 еквіваленту розсіяного склерозу у тварин.

4. 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 непрямому механізмі розвитку терапевтичного ефекту досліджених сполук з фармакокінетичної точки зору найбільш доцільною є комбінація метилпреднізолону з цитиколіном.

5. Експериментальний алергічний енцефаломієліт викликає ультраструктурні зміни нейронального, гліального і синаптичного апарата, які є основою деструкції нейронів і подальшої ініціалізації процесів їх апоптозу в неокортексі і гіпокампі експериментальних тварин. 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.

6. Фармакологічний аналіз антиноцицептивної та нейропротективної активності комбінованого застосування класичних та ад'ювантних знеболюючих засобів і засобів медикаментозного захисту мозку з метилпреднізолоном як препаратом базової гормонотерапії за умов експериментального алергічного енцефаломієліту дозволив визначити ефективні та раціональні напрямки фармакотерапії больового синдрому шляхом застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин», які сприяють збереженню достатнього антиноцицептивного потенціалу мелоксикаму та габапентину, а також встановити стратегічний напрямок нейропротективної терапії ЕАЕ завдяки композиції «метилпреднізолон-цитиколін», що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієліну і кардіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для усунення і/або ослаблення ноцицептивних больових синдромів при РС доцільно застосовувати нестероїдні протизапальні препарати, з метою зменшення побічних ефектів яких (ульцерогенна дія, підвищення рівня глікемії тощо) рекомендоване використання селективних блокаторів циклооксигенази 2 типу, зокрема, мелоксикаму.

2. Терапію невропатичних больових синдромів у хворих на РС рекомендується проводити призначенням ад'ювантних анальгетиків, в першу чергу – габапентину і прегабаліну. Водночас необхідно враховувати, що антиконвульсанти не виявляють достатньої специфічності для блокування тільки ноцицептивного сигналу, і можуть посилювати симптоми слабості і атаксії у хворих на розсіяний склероз

3. Для профілактики та лікування когнітивної дисфункції та неврологічного дефіциту як проявів нейродегенерації у хворих на РС може бути рекомендоване призначення цитиколіну на фоні використання метилпреднізолону як засобу базової гормонотерапії даної патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абдурасулова И. Н. Метаболические нарушения в мозге крыс и роль NMDA-глутаматных рецепторов в патогенезе ЭАЭ / И. Н. Абдурасулова, Ю. Л. Житнухин, А. В. Поздняков // Материалы XI Всероссийской конф. «Нейроиммунология». - С-Петербург, 2002. - С. 9-11.
2. Абдурасулова И. Н. Комбинированная блокада NMDA и GLUR1 AMPA рецепторов эффективно устраняет неврологические нарушения у крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / И. Н. Абдурасулова // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2007. - № 4. - С. 15-19.
3. Абдурасулова И. Н. Роль нейровоспаления, эксайтотоксичности и окислительного стресса в нейродегенерации при рассеянном склерозе / И. Н. Абдурасулова, В. М. Клименко // Нейроиммунология. – 2009. – Т.7, № 1. – С. 4.
4. Агафьина А. С. Болевой синдром в клинике рассеянного склероза: клинические формы, динамика, алгические варианты дебюта / А. С. Агафьина // Материалы междунар. конф. «Клинические нейронауки: нейрофизиология, неврология, нейрохирургия». – Ялта, 2003. – С. 107-108.
5. Агафьина А. С. Болевой синдром при рассеянном склерозе / А. С. Агафьина, В. М. Назаров, И. Д. Столяров // Нейроиммунология. – 2008. – Т.6, № 3-4. – С. 27-33.
6. Агафьина А. С. Варианты и динамика болевого синдрома при рассеянном склерозе / А. С. Агафьина // Материалы рос. науч.-практ. конф. «Клинические и теоретические аспекты острой и хронической боли». - Нижний Новгород, 2003. - С. 33-34.

7. Агафьина А. С. Невропатический болевой синдром в клинической картине рассеянного склероза: обзор литературы, клиника, лечение / А. С. Агафьина, И. Д. Столяров, Е. В. Ивашкова. – Санкт-Петербург, 2004. – 134 с.
8. Агафьина А. С. Применение мелбека (мелоксикама) в терапии болевого синдрома при рассеянном склерозе / А. С. Агафьина // Материалы Сибирской межрегион. науч.-практ. конф. «Рассеянный склероз: эпидемиология, клиника, лечение». – Новосибирск, 2004. – С. 95-96.
9. Акопова О. В. Снижение чувствительности митохондрий к Ca^{2+} –зависимому открытию поры в условиях длительной инкубации / О. В. Акопова, В. Ф. Сагач // Укр. биохим. журн. – 2004. – Т. 76, № 35. – С. 61–65.
10. Алгоритм автоматичного аналізу лімфоїдної популяції тимуса / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, В. А. Любомирская [та ін.] // Вісник морфології. – 2002. – Т. 2, № 3. – С. 361–362.
11. Алгоритми клінічного використання болетамуючих засобів (наркотичних та ненаркотичних анальгетиків) при гострому та хронічному синдромі: метод. рекомендації / О. П. Вікторов, О. В. Макаренко, В. Й. Мамчур, С. М. Дронов. – Київ: ДЕЦ України, 2011. – 56 с.
12. Алексеева Т. Г. Когнитивные и эмоционально-личностные нарушения при рассеянном склерозе / Т. Г. Алексеева // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / под ред. Е. И. Гусева, И. А. Завалишина, А. Н. Бойко. – Москва : Миклош, 2004. - С. 199-216.
13. Алифирова В. М. Анализ факторов риска развития рассеянного склероза в Томской области / В. М. Алифирова // Неврол. журнал. - 2012. - Т. 17, № 3 - С. 20-22.
14. Алифирова В. М. Когнитивные нарушения у больных рассеянным склерозом / В. М. Алифирова, Ю. Ю. Орлова, Н. Ф. Мусина // Бюл. сибирской медицины. – 2008. – № 3. – С. 62 – 67.

- 15.Андреева Н. И. Методические указания по изучению антидепрессивной активности фармакологических веществ / Н. И. Андреева // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва, 2000. – С. 121 – 126.
- 16.Арушунян Э. Б. Гиппокамп и нарушения познавательной деятельности / Э. Б. Арушунян, Э. В. Бейер // Журнал неврологии и психиатрии. – 2007. – № 7. – С. 72–77.
- 17.Архипов В. И. Эксайтотоксичность и экспериментальные подходы к нейропротекции / В. И. Архипов, М. В. Капралова, Е. В. Першина // Соврем. проблемы науки и образования. - 2013. - № 5 – С. 1-10.
- 18.А. с. 60033 Україна. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О. І. Корсунська, О. О. Нефьодов (Україна). – заявл. 08.04.2015 ; опубл. 05.06.2015.
- 19.Баринов А. Н. Роль окислительного стресса в заболеваниях нервной системы — пути коррекции / А. Н. Баринов // Трудный пациент. - 2012. - № 1. – С. 23-27.
- 20.Бархатова В. П. Патофизиология демиелинизирующего процесса // Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики / под ред. И. А. Завалишина, В. И. Головкина. – Москва: Детская книга, 2000. – С. 185-204.
- 21.Беленичев И. Ф. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев, В. И. Черний, Ю.М. Колесник. – Донецк : Издатель Заславский А.Ю., 2009. - 262 с.
- 22.Беленичев И. Ф. Механизмы формирования ишемической нейродеструкции: соотношение оксида азота и тиол-дисульфидной системы как фактор, определяющий тип гибели нейронов / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. – 2010. - Т. 6, № 2. – С. 20 – 27.
- 23.Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учеб. пособие. / Д. И. Кузьменко, Т. В. Жаворонок, И. П. Мамонтова [и др.] ;

- под ред. В. Ю. Сереброва, Г. А. Сухановой. – Томск : Сибирский гос. мед. ун-т, 2008. – 180 с.
24. Бисага Г. Н. Внешне неизмененное белое вещество головного мозга при рассеянном склерозе: результаты морфологического и нейровизуализационного исследования / Г. Н. Бисага, Л. С. Онищенко, О. Н. Гайкова // Нейроиммунология. - 2005. – Т. III, № 2. – С. 78-79.
 25. Бисага Г. Н. Ремиттирующий и прогрессирующий рассеянный склероз: иммунопатогенетические различия: медико-социальные аспекты РС / Г. Н. Бисага, Н. М. Калинина, С. Б. Акимова. - СПб.: Лекарства России, 2001. - 231 с.
 26. Боєчко Ф. Ф. Основні біохімічні поняття, визначення і терміни: навч. посібник / Ф. Ф. Боєчко, Л. О. Боєчко. – Київ : Вища шк., 1993. – 528 с.
 27. Бойко А. Н. Современные подходы к лечению рассеянного склероза / А. Н. Бойко, Е. И. Гусев // Неврол. вестник им. В.М. Бехтерева. – 2010. – Т. XLII, № 1. – С. 156—157.
 28. Бойко А. Н. Механизмы развития нейродегенеративного процесса при рассеянном склерозе — нейротрофическое влияние препаратов бета-интерферона сегодня и нейротрофические факторы завтра. Рассеянный склероз / А. Н. Бойко, С. В. Петров, В. А. Нестерова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2003. - № 2. - С. 83-90.
 29. Бойко А. Н. Перспективы новых методов патогенетической терапии рассеянного склероза / А. Н. Бойко, И. Д. Столяров, А. М. Петров // Неврол. вестник им. В. М. Бехтерева. – 2010. - Т. XLII, № 1. – С. 157-159.
 30. Болевые синдромы в неврологической практике / под ред. А. М. Вейна. – Москва : Медпресс, 1999. – 378 с.
 31. Бондар М. В. Сучасні аспекти метаболічного захисту мозку / М. В. Бондар // Медицина невідкладних станів. — 2013. — № 6. — С. 58-62.

- 32.Бутенко Г. М. Розсіяний склероз — захворювання багатобактерне / Г. М. Бутенко // Нова медицина. — 2002. — № 2. — С. 18-19.
- 33.Вальдман А. В. Центральные механизмы боли / А. В. Вальдман, Ю. Д. Игнатов. — Ленинград: Наука, 1976. — 231 с.
- 34.Васенина Е. Е. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии / Е. Е. Васенина, О. С. Левин // Нейропротективная терапия. — 2013. - № 3-4. - С. 39-46.
- 35.Васильев Ю. Н. Психо- и нейрофизиологический анализ антиноцицептивного эффекта и его роли в фармакологической коррекции эмоционального стресса болевого генеза / Ю. Н. Васильев, А. В. Дмитриев, Ю. Д. Игнатов // Нейрофармакологические аспекты эмоционального стресса и лекарственной зависимости. — Ленинград, 1978. — С. 27-38.
- 36.Вейн А. М. Течение рассеянного склероза у мужчин и женщин / А. М. Вейн // Журнал невропатологии и психиатрии. - 1995. - № 4. - С. 43-44.
- 37.Викторов А. П. НПВЛС и фармакотерапия хронической боли: проблемы эффективности и безопасности / А. П. Викторов // Рациональная фармакотерапия. — 2011. - № 2 (19) - С. 22-27.
- 38.Виноградов А. А. Оценка уровня стресса по шкале Ридера у женщин с рассеянным склерозом / А. А. Виноградов // Болезни и дисфункции нервной системы у женщин репродуктивного возраста: сб. науч. тр. - Рязань, 1995. - С. 11-12.
- 39.Виноградова Р. П. Принципи класифікації та номенклатури ферментів / Р. П. Виноградова // Укр. біохім. журнал. — 2001. — Т. 73, № 2. — С. 152-159.
- 40.Вінічук С. М. Розсіяний склероз (клініко-діагностичні та терапевтичні алгоритми) / С. М. Вінічук, О. А. Мяловіцька. — Київ, 2001. — 56 с.

- 41.Віничук С. М. Поширеність розсіяного склерозу в різних регіонах України. Особливості перебігу та лікування / С. М. Віничук, П. П. Уніч, В. В. Клименко // Укр. мед. часопис. - 2000. - № 6. - С. 51-54.
- 42.Власов Я. В. Особенности болевого синдрома у пациентов с рассеянным склерозом / Я. В. Власов, М. А. Курапов // Практик. медицина. – 2015. - № 5 (90). – С. 104–107.
- 43.Власов Я. В. Реабилитационный процесс при рассеянном склерозе: комплексность, непрерывность, эффективность / Я. В. Власов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2002. – Спец. вып. № 2. - С. 103-110.
- 44.Влияние флуоксетина и пароксетина на тревожное поведение молодых и взрослых пренатально стрессированных самців крыс / С. Г. Пивина, Ю. О. Федотова, В. К. Акулова, Н. Э. Ордян // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2011. – Т. 74, № 4. – С. 3-5.
- 45.Волошина Н. П. Рассеянный склероз: актуальность проблемы в Украине, современные аспекты иммунопатогенеза, клиники, диагностики и лечения. Украинский междисциплинарный консенсус / Н. П. Волошина, Н. Н. Грицай, И. Н. Дыкан // Новости медицины и фармации. — 2007. — № 215. — С. 20—24.
- 46.Волошина Н. П. Копаксон в лікуванні хворих на розсіяний склероз / Н. П. Волошина, Л. Ф. Шестопалова, Т. В. Негреба // Укр. вісник психоневрології. - 2002. - Т. 10, вип. 2 (31). - С. 199-202.
- 47.Волошина Н. П. Применение препарата митоксантрон (Ebewe) в терапии больных с прогрессивным типом течения рассеянного склероза / Н. П. Волошина, В. В. Васильевский, М. Е. Черненко // Укр. вісник психоневрології. - 2005. - Т. 13, № 3(44). - С. 53-55.
- 48.Волошин П. В. Аналіз поширеності та захворюваності на нервові хвороби в Україні / П. В. Волошин, Т. С. Міщенко, Є. В. Лекомцева // Міжнар. неврол. журнал. – 2006. – № 3 (7). - С. 9-13.

- 49.Воробьева Н. Л. Особенности противовирусного иммунитета у больных рассеянным склерозом / Н. Л. Воробьева // Нейроиммунология. – 2005. – Т. 3, № 1. – С. 28-32.
- 50.Воронина Т. А. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва : Медицина, 2005. – С. 263–281.
- 51.Высоцкий И. Ю. Система адениловых нуклеотидов в динамике острого токсического поражения печени летучими компонентами эпоксидной смолы ЭД–20 / И. Ю. Высоцкий // Соврем. проблемы токсикологии. – 2008. – № 3. – С.24–27.
- 52.Габибов А. А. Рассеянный склероз. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. Часть III / А. А. Габибов, О. О. Фаворова, О. Г. Кулакова / под ред. М. В. Угрюмова. – Москва: Наука, 2010. – 567 с.
- 53.Гайкова О. Н. Характеристика глиальных реакций при рассеянном склерозе / О. Н. Гайкова, Г. Н. Бисага, Л. С. Онищенко. - Нейроиммунология. - 2003. - Т. 1, № 2. - С. 35-36.
- 54.Гайнетдинова А. Н. Экспериментальное обоснование применения тиоктовой кислоты с метотрексатом в комбинированной терапии ревматоидного артрита на модели адьювантного артрита / А. Н. Гайнетдинова, Л. Н. Залялютдинова, Д. И. Абдулганиева // Практ. медицина. – 2015. – № 4 (123). – С. 198–202.
- 55.Гамазков О. А. Нейротрофические факторы мозга / О. А. Гамазков : Справочно-информационное издание. Электронная версия. - Москва, 2004. – 311 с.
- 56.Гланц С. Медико–биологическая статистика [пер.с англ.] / С. Гланц. – Москва: Практика, 1998. – 459 с.

57. Головенко Н. Я. Физико-химическая фармакология / Н. Я. Головенко. – Одесса : Астропринт, 2004. – 720 с.
58. Головкин В. И. Рассеянный склероз / В. И. Головкин // Материалы ежегодного 9-го симпозиума Всероссийского общества рассеянного склероза, 25-29 мая 2000г. - Санкт-Петербург : Лекарства России, 2000. - С. 3-8.
59. Гончаренко М. С. Метод оценки перекисного окисления липидов / М. С. Гончаренко, А. М. Латинова // Лаб. дело. – 1985. – № 1. – С. 60–61.
60. Гузева В. И. Рассеянный склероз. Диагностика и лечение, возрастные аспекты / В. И. Гузева, М. Л. Чухловина. – СПб.: ООО «Фолиант», 2003. – 174 с.
61. Гусев Е. И. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / Е. И. Гусев, И. А. Завалишин, А. Н. Бойко. – Москва, 2004. – 540 с.
62. Гусев Е. И. Рассеянный склероз: от изучения иммунопатогенеза к новым методам лечения / Е. И. Гусев, А. Н. Бойко. - Москва: Губернская медицина, 2001. - 128 с.
63. Гусев Е. И. Нейропротективное влияние длительного курса бета-интерферона при РС: прямые и непрямые механизмы / Е. И. Гусев, А. Н. Бойко, Н. В. Хачанова // Журнал неврологии и психиатрии. - 2006. – Т. 106, № 6. – С. 70-74.
64. Гусев Е. И. Рассеянный склероз / Е. И. Гусев, Т. Л. Демина, А. Н. Бойко. – Москва, 1997. – 464 с.
65. Давыдовская М. В. Нейродегенеративный процесс при рассеянном склерозе и возможные пути его коррекции / М. В. Давыдовская, А. Н. Бойко, Е. И. Гусев // Журнал. неврологии и психиатрии. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 44—52.
66. Данилов А. Б. Нейропатическая боль / А. Б. Данилов, О. С. Давыдов. — Москва : Боргес, 2007. — 192 с.

67. Данилов А. Б. Центральная нейропатическая боль: клинико-диагностические аспекты и возможности терапии на основе доказательств / А. Б. Данилов, О. С. Давыдов // Неврология. – 2009. – № 1. – С. 60-64.
68. Дзюба А. Н. Про- и антиоксидантные механизмы при рассеянном склерозе / А. Н. Дзюба, Ю. Н. Сорокин // Укр. мед. часопис. – 2004. – № 5. – С. 30-35.
69. Евтушенко С. К. Первичные проявления периферической формы рассеянного склероза (диагностика, клиника, лечение) / С. К. Евтушенко, С. Г. Блиндарук // Междунар. неврол. журнал. — 2007. — № 5 (15). — С. 9-13.
70. Евтушенко С. К. Современные подходы к лечению рассеянного склероза: достижения, разочарования, надежды / С. К. Евтушенко, И. Н. Деревянко // Междунар. неврол. журнал. - 2006 - № 2 (6). - С. 23-25.
71. Євтушенко С. К. Курсова терапія дітей з розсіяним склерозом з використанням внутрішньовенного імуноглобуліну (Біовен моно) / С. К. Євтушенко, М. А. Москаленко // Міжнар. неврол. журнал. — 2014. — № 4(66). — С. 80-87.
72. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. — 2003. — № 2 (22). — С. 108–109.
73. Завалишин И. А. Патогенез и лечение рассеянного склероза / И. А. Завалишин, Т. Д. Жученко // Вестник РАМН. – 2001. – № 7. – С. 18-22.
74. Завалишин И. А. Вопросы диагностики и лечения рассеянного склероза / И. А. Завалишин, А. В. Переседова, Н. И. Стойда // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. - 2011. – Т. 111, № 6. – С. 88-95.

- 75.Завалишин И. А. Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство. Т. 1 / И. А. Завалишин, М. А. Пирадов, А. Н. Бойко. – Москва : РООИ «Здоровье человека», 2014. – 400 с.
- 76.Заргарова Т. А. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит – модель рассеянного склероза / Т. А. Заргарова, О. О. Фаворова // Иммунология. – 1999. - № 2. – С. 5 – 8.
- 77.Захаров Н. Б. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках «Силуфол» / Н. Б. Захаров, В. Н. Рубин // Лаб. дело. – 1980. – № 12. – С. 733 – 738.
- 78.Зыбина Н. Н. «Окислительный стресс» при рассеянном склерозе Иммуноопосредованный ремитирующий рассеянный склероз / Н. Н. Зыбина, Г. Н. Бисага, М. Ю. Фролова ; под ред. В. И. Головкина, Н. М. Калининой. - СПб.: Роза мира, 2003. – 289 с.
- 79.Изучение иммуномодулирующих свойств ацетаминофена / М. В. Горецкая, В. М. Шейбак, В. Л. Мороз, Я. Р. Мацюк // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 3. – С. 18–21.
- 80.Иноземцев А. Н. Изучение условного рефлекса пассивного избегания в модифицированной трехкамерной установке / А. Н. Иноземцев, А. П. Бельник, Р. У. Островская // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2007. – Т. 70, № 2. – С. 67–69.
- 81.Калуев А. В. Проблемы изучения стрессового поведения / А. В. Калуев. – Киев : CSF, 1999. – 132 с.
- 82.Канунникова Н. П. Роль нарушения функций митохондрий мозга в процессах нейродегенерации / Н. П. Канунникова, Н. Аль-Хаммаш // Материалы респ. науч.-практ. конф. «Современные направления в лечении и реабилитации психических и поведенческих расстройств». - Гродно : ГрГМУ, 2010. - С. 76-79.
- 83.К вопросу доклинического изучения мелоксикама и его лекарственных форм в экспериментах на животных / Р. А. Мустафин, Н.

- М. Насыбуллина, И. А. Газеев, Л. А. Поцелуева // Современ. наукоемкие технологии. – 2010. – № 2. – С. 16–19.
84. Когнитивные нарушения при рассеянном склерозе / Р. Ц. Бембеева, Ю. В. Микадзе, А. С. Петрухин [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2006. – Т. 106, № 12. – С. 11–19.
85. Коваленко П. А. Современные методы лечения рассеянного склероза / П. А. Коваленко, С. В. Шаманский, Н. И. Базий // Воен.- мед. журнал. – 2001. – Т. 322, № 10. – С. 45-52.
86. Киселева Е. В. Неврологические и иммунологические характеристики рассеянного склероза в условиях патологии щитовидной железы / Е. В. Киселева, Н. Н. Спирин // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1. – С. 962-966.
87. Копаксон в лечении рассеянного склероза (сборник статей) / под ред. И. А. Завалишина, Г. Я. Шварца. – Москва : Миклош, 2007. – 310 с.
88. Корсунська О. І. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О. І. Корсунська, О. О. Нефьодов. – Дніпропетровськ : Літограф, 2015. – 203 с.
89. Кукушкин М. Л. Клинические рекомендации. Болевой синдром: патофизиология, клиника, лечение / М. Л. Кукушкин, Г. Р. Табеева, Е. Ф. Подчуфарова; под ред. акад. РАМН Н. Н. Яхно. — Москва: ИМА-пресс, 2011. — 72 с.
90. Кукушкин М. Л. Общая патология боли / М. Л. Кукушкин, Н. К. Хитров. — Москва : Медицина, 2004. — 144 с.
91. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Киев : Вища школа. головне вид-во, 1983. – 383 с.
92. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1990. – 293 с.

- 93.Лапач С. Н. Статистические методы в медико–биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев : Морион, 2001. – 408 с.
- 94.Липперт Г. Международная система единиц (СИ) в медицине / Г. Липперт. – Москва : Медицина, 1980. – 208 с.
- 95.Лечение хронической боли флувоксамином, амитриптилином и транскраниальной электростимуляцией мозга / С. В. Тарасова, А. В. Амелин, А. А. Скоромец [и др.] // Журнал неврологии. и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2008. – № 6. – С. 43 – 46.
- 96.Мазунин И. О. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека / И. О. Мазунин, Н. В. Володько, Е. Б. Стариковская // Молекулярная биология. – 2010. – Т.44, № 5. – С. 755–772.
- 97.Мамчур В. И. Сравнительный фармакологический анализ пероральных форм некоторых В-витаминных комплексов в условиях экспериментальных нейропатий / В. И. Мамчур, С. Н. Дронов, А. Г. Родинский // Здоров'я України. – 2011. - № 2 (17). – С. 41 – 43.
- 98.Марков Д. А. Рассеянный склероз / Д. А. Марков, А. Л. Леонович. – Москва : Медицина, 1976. - 296 с.
- 99.Мевх А. Т. Изучение эндопероксидпростагландинсинтазы микросомной фракции тромбоцитов человека / А. Т. Мевх, И. И. Басевич, С. Д. Варфоломеев // Биохимия. - 1982. - Т. 47, № 10 - С. 1635-1639.
100. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств / С. М. Дроговоз, С. И. Сальникова, Н. П. Скаун, В. В. Слышков. – Киев : ФКМЗ Украины, 1994. – 46 с.
101. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / И. Ф. Беленичев, Ю. В. Колесник,

- С. В. Павлов [и др.] // Междунар. неврол. журнал. – 2009. – № 4 (20). – С. 20–26.
102. Михайлов В. А. Болевой синдром / В. А. Михайлов, Ю. Д. Игнатов. – Ленинград : Медицина, 1990. – 336 с.
 103. Міщенко Т. С. Розсіяний склероз: глобальні перспективи / Т. С. Міщенко, О.Д. Шульга, Н. В. Бобрик // Укр. мед. часопис. — 2014. — № 3 (101). — С. 84—87.
 104. Мурешану Д. Ф. Нейропротекция и нейропластичность — целостный подход и перспективы / Д. Ф. Мурешану // J. Neurological Sciences. — 2007. — Vol. 257. — P. 38—43.
 105. Мяловицька О. А. Ефективність препарату Цитофлавін у лікуванні пацієнтів із розсіяним склерозом і втомою / О.А. Мяловицька // Укр. мед. часопис. - 2015. - № 2 (106), III/IV. - С. 45-47.
 106. Науково – практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та робіт і з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайретдінова. – Киев, 2002. – 155 с.
 107. Негреба Т. В. Клиническая характеристика прогрессивных типов течения рассеянного склероза / Т. В. Негреба // Укр. вісник психоневрології. - 2003. - Т. 11, № 1(34). - С. 16-18.
 108. Недзведь Г. К. Пояснично-крестцовый болевой синдром как начальные проявления рассеянного склероза / Г. К. Недзведь // Здравоохранение Белоруссии. — 1977. — № 10. — С. 69-72.
 109. Недзведь Т. М. Морфологическая диагностика рассеянного склероза / Т. М. Недзведь // Мед. журнал. – 2006. - № 4. - С.11-13.
 110. Нефедов А. А. Возможности фармакологической коррекции болевого синдрома при рассеянном склерозе / А. А. Нефедов // Буковин. мед. вісник. – 2015.- Т. 19, № 1 (73). – С. 232-236.
 111. Нефедов А. А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента

- рассеянного склероза / А. А. Нефедов, В. И. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, № 2. – С. 4-11.
112. Нефедов А. А. Изучение анальгетического потенциала антидепрессанта в терапии невропатического болевого синдрома в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А. А. Нефедов, Н. А. Ковтуненко, Л. А. Легкая // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини», 18-19 грудня 2015 року. – Одеса, 2015. –С. 120-122.
113. Нефедов А. Изучение влияния комбинированного использования метилпреднизолона с цитиколином на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его образований в условиях рассеянного склероза в эксперименте / А. Нефедов, В. Мамчур // Modern Science - Moderní věda. – Praha: Česká republika, Nemoros, 2016. - № 1. - Р. 142-156.
114. Нефедов А. А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза / А. А. Нефедов // Материалы Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 90-летию со дня рождения акад. АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014 года: тез. ; под ред. С. Б. Середенина, Н.Г. Незнанова, Э.Э. Звартау. - Санкт-Петербург, 2014. – С. 129.
115. Нефедов А. А. Опыт применения цитиколина в экспериментальной терапии моделированного аллергического энцефаломиелита / А. А. Нефедов, В. И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 2, Т. 4 (121). – С. 165-170.
116. Нефедов А. А. Особенности ультраструктуры фронтальной коры и гиппокампа крыс в условиях экспериментального аллергического

- энцефаломиелита / А. А. Нефедов, В. Й. Мамчур, И. В. Твердохлеб // *Morphologia*. – 2016. – Т. 10, № 1. – С. 54-61.
117. Нефедов А. А. Оценка антиноцицептивного потенциала антидепрессантов в терапии невропатической боли, индуцированной экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А. А. Нефедов, В. И. Мамчур // *Буковин. мед. вісник*. – 2016. – Т. 20, № 1 (77). – С. 94-98.
118. Нефедов А. А. Оценка эффективности нейропротективной терапии экспериментального аллергического энцефаломиелита в условиях базовой терапии солу-медролом / А. А. Нефедов // *Biomedical Biosocial Antropology*. – 2015. - № 24. – С. 65-70.
119. Нефедов А. А. Применение цитиколина для коррекции ультраструктурных изменений ЦНС, индуцированных экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А. А. Нефедов, В. И. Мамчур // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2016. – Вип. 2, Т. 2 (129). – С. 235-240.
120. Нефедов А. А. Прогнозирование в экспериментах *in silico* взаимодействия габапентина с метилпреднизолоном как средств комбинированной терапии демиелинизирующих заболеваний / А. А. Нефедов, В. И. Мамчур, В. Б. Ларионов // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2016. - № 2 (48). – С. 67-73.
121. Нефьодов О. О. Аналіз впливу цитиколіну на безумовно-рефлекторну активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О. О. Нефьодов // *Хист*. – 2015. – Вип. 17. – С. 378.
122. Нефьодов О. О. Антидепрессанты: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // *Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісник укр. мед. стома тол. академії*. – 2015. – Т. 15, вип. 3(51), ч.1. – С. 225-228.
123. Нефьодов О. О. Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому

- та демієлінізуючої патології / О. О. Нефьодов, В. Б. Ларіонов, М. Я. Головенко // Журнал НАМН. – 2015. - Т. 21, № 3-4. – С. 398-404.
124. Нефьодов О. О. Вивчення біофармацевтичної взаємодії антиконвульсанта з глюкокортикостероїдом за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, О. А. Музичок, О. І. Денисенкова // Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, пам'яті проф.. В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», 24-25 листопада 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 59-60.
125. Нефьодов О. О. Вивчення впливу α -ліпоєвої кислоти на поведінкові реакції у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, О. В. Кулик // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2015. - № 1 (22). – С. 151.
126. Нефьодов О. О. Вивчення впливу антиконвульсанта габапентину на поведінкові реакції у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Матеріали наук.-практ. конф. «Фундаментальна та клінічна медицина», 20-22 травня 2015 р. – Київ, 2015. – С. 45-46.
127. Нефьодов О. О. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом у тесті «відкрите поле» / О. О. Нефьодов // Одес. мед. журнал. – 2015. - № 5 (151). – С. 14-19.
128. Нефьодов О. О. Вплив знеболюючих засобів на дослідно-орієнтовну функцію ЦНС у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Світ медицини та біології. – 2014. - № 4 (46). – С. 135-139.
129. Нефьодов О. О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості

- анальгетиків / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, № 4. – С. 4-9.
130. Нефьодов О. О. Експериментальна оцінка впливу антиконвульсантів габапентину та прегабаліну на поведінкові реакції в тесті «відкрите поле» за умов розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, О. В. Кривошей, О. А. Музичок // Матеріали наук. робіт учасників між нар. наук.-практ. конф. «Сучасні тенденції розвитку медичної науки та медичної практики», 25-26 грудня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 140-141.
131. Нефьодов О. О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормонотерапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформ. лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур. – Київ : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.
132. Нефьодов О.О. Зміни анальгетичного потенціалу антиконвульсантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 3, Т. 1 (122). – С. 161-164.
133. Нефьодов О. О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій анальгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 1(25). - С. 35-38.
134. Нефьодов О. О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності РGH-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковин. мед. вісник. – 2015. – Т. 19, № 3 (75). – С. 114-117.
135. Нефьодов О. О. Зміни рухово-дослідницької поведінки тварин під впливом антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Світ медицини та біології. - 2015. - № 4 (54). – С. 131-134.

136. Нефьодов О. О. Дослідження анальгетичних властивостей кеторолака за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу // О. О. Нефьодов, О. А. Музичок, О. І. Денисенкова, Д. Г. Вернигора // Матеріали міжнар. наук.-метод. конф. «Актуальні питання медицини», 27 березня 2015 р. – Дніпропетровськ, 2015. – С. 171-173.
137. Нефьодов О. О. Дослідження впливу амітриптиліну на поведінкові реакції в щурів у тесті «відкрите поле» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов // Матеріали II наук.-практ. конф. З міжнародною участю «Природничі читання», 14-17 травня 2015 року. – Чернівці, 2015. – С. 179-180.
138. Нефьодов О. О. Дослідження впливу лорноксикаму на дослідно-орієнтовану функцію ЦНС у щурів за умов експериментального моделювання розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студ. з міжнар. участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015», 14-15 травня 2015 р. – Запоріжжя, 2015. – С. 30.
139. Нефьодов О. О. Дослідження місця габапентину та прегабаліну при ноцицепції за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали III Міжнар. наук.-практ. конф. «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», 22-23 жовтня 2015 р. – Київ : Вид-во «Мегапринт», 2015. – С. 81-82.
140. Нефьодов О. О. Експериментальне дослідження знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментальної патології ЦНС / О. О. Нефьодов, О. В. Кулик, В. В. Кривошей // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів», 24-25 квітня 2015 року. – Львів : ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 94-95.
141. Нефьодов О. О. Експериментальне дослідження ненаркотичного анальгетика мелоксикама на поведінкові реакції у щурів із експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О. О. Нефьодов, О.

- А. Музичок, О. І. Денисенкова // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», 23-24 квітня 2015 р. – Суми. – С. 172.
142. Нефьодов О. О. Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, В. Б. Ларіонов, С. М. Дронов // Світ медицини та біології. - 2016. - № 2 (56). – С. 52-58.
143. Нефьодов О. О. Механізми розвитку та загальні принципи фармакотерапії болю / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур // Рационал. фармакотерапия. – 2011. – № 2 (19). – С. 38-42.
144. Нефьодов О. О. Місце антиконвульсанта топірамата у знеболенні при розсіяному склерозі / О. О. Нефьодов, О. В. Руденко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії», 09-10 листопада 2015 р. – Вінниця, 2015. – С. 193-194.
145. Нефьодов О. О. Місце неопіоїдних анальгетиків та роль оксиду азоту в механізмах болю та спазму / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, В. І. Опришко // Укр. мед. альманах. – 2011. – Т. 14, № 2. – С. 46-52.
146. Нефьодов О. О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, Ю. В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип.4, Т.2 (114). – С. 205-208.
147. Нефьодов О. О. Нейротропні ефекти антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №6 (46). – С. 28-33.
148. Нефьодов О. О. Особливості антиноцицептивних ефектів антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, О. В. Кривошей // Матеріали наук. робіт учасників міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання сучасної

- медицини: наукові дискусії», 23-24 жовтня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 98-100.
149. Нефьодов О. О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформ. лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур. – Київ : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.
150. Нефьодов О. О. Оцінка змін рухової та емоційної активності щурів під впливом антиконвульсантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. – 2016. - № 1(73). – С. 12-18.
151. Нефьодов О. О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 4 (116). – С. 108-112.
152. Нефьодов О. О. Оцінка знеболюючого потенціалу парацетамолу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов, О. В. Руденко // Матеріали всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених НМАПО ім.. П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я», 30 квітня 2015 року. – Київ, 2015. – С. 47-48.
153. Нефьодов О. О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
154. Нефьодов О. О. Порівняльна характеристика болезаспокійливої активності протисудомних засобів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О. О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 2 (26). - С. 45-47.

155. Нефьодов О. О. Роль імунотерапії у хворих на розсіяний склероз в практиці сімейного лікаря / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, О. І. Корсунська // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 1 (113). – С. 25-30.
156. Нефьодов О. О. Фармакокінетичні особливості вибору знеболюючого засобу за умов експериментального розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, С. М. Дронов, В. С. Смандич // Матеріали XXXIII Всеукр. наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», 8 квітня 2016 року. – Харків : НФаУ, 2016. – С. 143-144.
157. Нефьодов О. О. Фармакологічний аналіз терапії болю за умов розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов // Матеріали XV конгресу СФУЛТ, 16-18 жовтня 2014 р. – Чернівці, Київ, Чикаго, 2014. – С. 365.
158. Нефьодов О. О. Фармакотерапевтична корекція больових синдромів при розсіяному склерозі / О. О. Нефьодов // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.» [30-31 травня 2014 р.]. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2014. – С. 102-104.
159. Нефьодов О. О. Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - № 3 (44). – С. 10-16.
160. Новик А. А. Оценка качества жизни больного в медицине / А. А. Новик, С. А. Матвеев, Т. И. Ионова // Клинич. медицина. – 2000. – № 2. – С. 10-13.
161. Новиков Д. А. Статистические методы в медико–биологическом эксперименте (типовые случаи) / Д. А. Новиков, В. В. Новочадов. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.
162. Одинак М. М. Новые подходы к антиоксидантной терапии при рассеянном склерозе / М. М. Одинак, Г. Н. Бисага, И. В. Зарубина //

- Журнал невропатологии и психиатрии. - 2002. - Спец. вып. «Рассеянный склероз». – С. 72-75.
163. Одинак М. М. Нейропротекция при рассеянном склерозе / М. М. Одинак, Г. Н. Бисага // Нейроиммунология. — 2005. — Т. 3, № 2. — С. 105-106
 164. Одинак М. М. Можно ли излечиться от рассеянного склероза? Клинические результаты операции аутологичной трансплантации стволовых клеток / М. М. Одинак, Г. Н. Бисага, А. В. Поздняков // Нейроиммунология. — 2005. — Т. 3, № 2. — С. 105.
 165. Орлова Т. В. Сравнительное изучение анальгетического действия нестероидных противовоспалительных средств в форме ректальных суппозиторий / Т. В. Орлова, Т. А. Панкрушева, М. В. Покровский // Научные ведомости. Серия : «Медицина. Фармация». – 2012. – № 4 (123). – С. 198–202.
 166. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса / Е. А. Аверченко, Н. С. Кавок, А. М. Степаненко [и др.] // Біофізичний вісник. – 2009. – № 22 (1). – С. 49–56.
 167. Павленко С. С. Эпидемиология боли. Обзор / С. С. Павленко // Неврол. журнал. - 1999. - Т.4, № 1. - С. 41-46.
 168. Пат. 111354 Україна, МПК А 61 К 31/00, А 61 Р 25/00. Спосіб лікування розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур, С. М. Дронов, О. В. Макаренко; заявник та патентовласник Нефьодов Олександр Олександрович, Мамчур Віталій Йосипович, Дронов Сергій Миколайович, Макаренко Ольга Володимирівна – № u 201604214 ; заявл. 18.04.16; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21.
 169. Петров А. М. Некоторые аспекты современной иммунодиагностики и иммунотерапии рассеянного склероза / А. М. Петров, И. Д. Столяров // Материалы X Всерос. съезда неврологов с междунар. участием. - Нижний Новгород, 2012. – С. 235.

170. Петров О. В. Информационная концепция боли / О. В. Петров, В. В. Лихванцев, В. В. Суботин // Междунар. мед. журнал. – 1998. – № 9-10. – С. 795-803.
171. Пирс Э. Гистохимия [пер. с англ.] / Э. Пирс. – Москва: Изд-во Иностранная лит., 1962. – 962 с.
172. Попова Е. В. Опыт применения препарата натализумаб в МГЦРС / Е. В. Попова, М. В. Давыдовская, В. В. Овчаров // Материалы X Всерос. съезда неврологов с междунар. участием. - Нижний Новгород, 2012. - С. 237.
173. Радионова К. С. Оригинальный ноотропный препарат «Ноопепт» устраняет дефицит памяти, вызванный блокадой М– и Н–холинорецепторов у крыс / К. С. Радионова, А. П. Бельник, Р. У. Островская // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 1. – С. 65–68.
174. Рассеянный склероз в Украине: распространенность, течение, прогноз, лечение, фармакоэкономика / Н. П. Волошина, В. И. Тайцлин, Т. В. Негреба [и др.] // Укр. вісник психоневрології. - 2007. - Т.15, № 1(50). - С. 6-21.
175. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / под ред. Е. И. Гусева, И. А. Завалишина, А. Н. Бойко. – Москва: Миклош, 2004. – 342 с.
176. Рассеянный склероз. Практическое руководство / под ред. Столярова И. Д., Осетрова Б. А. - СПб.: ЭЛБИ - СПб., 2002. – 176 с.
177. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т. Е. Шмидт, Н. Н. Яхно. – 2–е изд. – Москва: МЕДпресс–информ, 2010. – 272 с.
178. Роль оксида азота в предупреждении когнитивных нарушений при нейродегенеративном повреждении мозга крыс / Е. Б. Манухина, М. Г. Пшенникова, А. В. Горячева [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 10. – С. 371–375.

179. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – Москва, 2005. – 431 с.
180. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. – Москва: Медицина, 1996. – 542 с.
181. Селиванов Е. В. Красители в биологии и медицине: Справочник / Е. В. Селиванов. – Барнаул : Азбука, 2003. – 40 с.
182. Сергеев В. В. Психические расстройства у больных с демиелинизирующими заболеваниями Н. С. / В. В. Сергеев, З. А. Скударнова // Неврозоподобные состояния: сб. науч. тр. - Смоленск, 1988. - С. 43-46.
183. Серебряная Н. Б. Исследование протективного действия препарата ферровир при остром экспериментальном аллергическом энцефаломиелите/ Н. Б. Серебряная, Н. М. Карпенко, Ю. Л. Житнухин // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. IX, № 1. – С. 33–38.
184. Степанова Т. Ю. Вплив аміксину на функціональну активність макрофагів різного походження / Т. Ю. Степанова // Вісник Одес. нац. ун-ту. Серія: Біологія. – 2004. – Т. 9, №. 2. – С. 188-192.
185. Смагина И. В. Влияние черепно-мозговой травмы на риск развития и скорость прогрессирования рассеянного склероза / И.В. Смагина, А. С. Федянина., С. А. Ельчанинова // Неврол.журнал. — 2011. — № 2. — С. 11-13.
186. Современные аспекты аддитивной терапии рассеянного склероза С. К. Евтушенко, Я. А. Гончарова, В. А. Симонян [и др.] // Укр. вісник психоневрологів. - 2010. - Т.18, № 3(64). - С. 79-80.
187. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. Прохоровой М. И. - Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. - 272 с.
188. Соколова Л. І. Застосування препаратів альфа-ліпоевої кислоти та вітамінів групи В у лікування хворих на розсіяний склероз / Л.

- I. Соколова, Г. В. Гудзенко, I. С. Лобанова // Укр. неврол. журнал. - 2012. - № 2. – С. 72–78.
189. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л. А. Даниловой. – СПб.: Питер, 2003. – 736 с.
190. Сравнительная оценка влияния антиконвульсантов различных групп на когнитивные процессы в норме, морфофункциональные характеристики нейронов сенсомоторной коры и нейроапоптоз в условиях коразолового киндинга / Н. П. Шастун, В. И. Опрышко, С. В. Павлов, Н. В. Бухтиярова // Фармакология и лекарственная токсикология. – 2015. – № 3 (44). – С. 38–44.
191. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – Москва: Медицина, 1977. – С. 66–68.
192. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – Київ : Авіцена, 2002. – 527 с.
193. Судаков Н. П. Митохондриальная дисфункция как один из механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний / Н. П. Судаков, В. А. Деев, С. Б. Никифоров // Лаб. діагностика. - 2008. - № 2 (44). – С. 58-64.
194. Торопина Г. Г. Боль при рассеянном склерозе / Г. Г. Торопина, Т. Е. Шмидт // Неврол. журнал. - 2003. - Т. 8, № 1. - С.40-43.
195. Трифонова О. В. Лабильность когнитивных нарушений и электрофизиологических параметров Р300 на фоне тепловой пробы у больных рассеянным склерозом / О. В. Трифонова // Нейроиммунология. - 2007. - Т. V, № 2. - С. 118-119.
196. Трушникова Т. Н. Мозговой и цилиарный нейротрофические факторы у больных рассеянным склерозом / Т. Н. Трушникова, Е. Л. Медведева, Т. В. Байдина // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2014. - № 10, вып. 2. – С. 33-36.

197. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. — Москва : Мир, 1975. — 324 с.
198. Федосеев С. В. Структура бокового синдрома у больных на рассеянный склероз / С. В. Федосеев // Таврич. мед.-биол. вестник. — 2012. — Т. 15, № 1 (57). — С. 268-271.
199. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба // Лаб. дело. — 1988. — № 11. - С. 678–681.
200. Чекман И. С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов / И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев. — Киев: ДФЦ МЗ Украины, 2010. — 81 с.
201. Чувствительный метод определения активности простагландин H синтетазы / Ю. А. Кузнецова, В. Б. Ромаха, М. Л. Строкин, А. Т. Мевх // Вестник Моск. ун-та. Серия : Химия. — 1998. — Т. 39, № 5. — С. 302-304.
202. Шишкина Г. Т. Влияние флуоксетина на двигательную активность: возможное участие дофамина / Г. Т. Шишкина, А.М. Юдина, Н.Н. Дыгало // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. — 2006. — Т.56, № 4. — С. 523–528
203. Шлейкин А. Г. Сопряженность антиоксидантной и иммунной систем организма при развитии аутоиммунных процессов. Иммуноопосредованный ремиттирующий рассеянный склероз / А. Г. Шлейкин ; под ред. В. И. Головкина, Н. М. Калинина. - СПб.: Роза мира, 2003. - 230 с.
204. Шмидт Т. Е. Воспаление и нейродегенерация при рассеянном склерозе / Т. Е. Шмидт // Неврол. журнал. - 2006. - № 3. - С.46-52.
205. Шмидт Т. Е. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т. Е. Шмидт, Н. Н. Яхно. — 5-е изд. — Москва: МЕДпресс-информ, 2016. — 272 с.

206. Экспериментальное включение арахидоновой кислоты в макрофаги / М. Л. Строкин, М. Г. Сергеева, А. Т. Мевх, С. Д. Варфоломеев // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 3. – С. 386-393.
207. Экспрессия мРНК цитокинов в селезенке и спинном мозге крыс с различной тяжестью ЭАЭ / И. Н. Абдурасулова, Ю. Л. Житнухин, Е. А. Тарасова, В. М. Клименко // Мед. иммунология. – 2004. – Т. 6, № 1-2. – С. 37-46.
208. Эндопероксидпростагландинсинтетазы микросомной фракции тромбоцитов человека в процессе реакции / А. Т. Мевх, И. И. Басевич, И. Ярвинг, С.Д. Варфоломеев // Биохимия - 1982. - Т. 47, № 11 - С. 1852-1858.
209. Ярош А. А. Алгические и парестетические явления при начинающемся рассеянном склерозе / А. А. Ярош, Т. И. Ильяш // Врачеб. дело. — 1985. — № 12. — С. 80-82.
210. A comparative study of efficacy and safety of gabapentin versus amitriptyline as coanalgesics in patients receiving opioid analgesics for neuropathic pain in malignancy / M. Banerjee, S. Pal, B. Bhattacharya [et al.] // Indian J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 45, N 4. – P. 334–338.
211. ACD/pKaDB [Электронный ресурс]: Режим доступа – http://www.whocc.no/atc_ddd_index/
212. Analgesic effects of lidocaine, morphine and diclofenac on movement-induced nociception, as assessed by the Knee-Bend and CatWalk tests in a rat model of osteoarthritis / J. Ferreira-Gomes, S. Adaes, M. Mendonca, J.M. Castro-Lopes // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2012. – Vol. 101, N 4. – P. 617–624.
213. Archibald C. J. Pain prevalence, severity and impact in a clinic sample of multiple sclerosis patients / C. J. Archibald, P. J. McGrath // Pain. - 1994. - Vol. 58 — P. 89-93.
214. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to

- modify notch-1/sonic hedgehog balance / F. G. Mastronardi, W. Min, H. Wang [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172, N 10. – P. 6418-6426.
215. Bansil S. Serum soluble interleukin-2 receptor levels in chronic progressive, stable and steroid-treated multiple sclerosis / S. Bansil, R. Troiano, C. D. Cook // Acta Neurol Scand. – 1991. – Vol. 84, N 4. – P. 282-285.
216. Barak Y. Effect of interferon beta - 1b on cognitive functions in multiple sclerosis / Y. Barak, A. Achiron // Eur. Neurol. - 2002. - Vol. 47. - P. 11-14.
217. Bitsch A. Biological markers for MS / A. Bitsch, T. Bogumil, S. Poser // Inter. MS J. – 1998. - Vol. 5, N 1. - P. 7-15.
218. Bjartmar C. N-acetylaspartate is an axon-specific marker of mature white matter in vivo: a biochemical and immunohistochemical study on the rat optic nerve / C. Bjartmar, J. Battistuta, N. Terada // Ann. Neurol. – 2002. – Vol. 51, N 1. – P. 51-58.
219. Boccaccio G. L. Multiple sclerosis: from a myelin point of view / G.L. Boccaccio, L. Steinman // J. Neurosci. Res. – 1996. – Vol. 45, N 6. – P. 647 – 654.
220. Bolton C. MK-801 limits neurovascular dysfunction during experimental allergic encephalomyelitis / C. Bolton, C. Paul // J. Pharm. Exp. Ther. – 1997. – Vol. 282. – P. 397-402.
221. Bonda D. J. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention / D. J. Bonda, X. Wang, G. Perry [et al.]. - Neuropharmacology. - 2010. – Vol. 59, N 4–5. – P. 290–294.
222. Boyko A.N. Alemtuzumab-associated infusion reactions in CARE-MS II / A. N. Boyko, D. Arnold, J. Cohen // Eur. J. Neurology. – 2012. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. 715.
223. Buljevac D. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis / D. Buljevac // Brit. Med. J. - 2003. - Vol. 20. - P. 646-652.

224. Burt R. K. T cell-depleted autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: report on the first three patients / R. K. Burt, A. E. Traynor, B. Cohen // Bone. Marrow. Transplant. – 1998. – Vol. 21, N 6. – P. 537-541.
225. Bornsgein M.B. A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis / M. B. Bornsgein, A. Miller, S. Slagle // Neurology. – 1991. – Vol. 41. – P. 533-539.
226. Bruck W. The pathology of MS is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. / W. Bruck // J. Neurol. – 2005. - Vol. 252, Suppl. 5. – P.V/3-V/9.
227. Burch J.W. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin / J. W. Burch, N. Stanford, P. W. Majerus // J. Clin. Invest. – 1978. – Vol. 61. – P. 314-319.
228. Carroll M. N. Observation on the neuropharmacology of morphine and morphinelike analgesia / M. N. Carroll, R. K. S. Lim // Arch. J. Pharmacodyn. Ther. – 1960. – Vol. 125. – P. 383-403.
229. Comparison of antinociceptive and antidiabetic effects of sertraline and amitriptyline on streptozotocin-induced diabetic rats / D. Mahmood, M. Akhtar, D. Vohora, R.Khanam // Hum. Exp. Toxicol. – 2010. – Vol. 29, N 10. – P. 881 – 886.
230. Cusi C. Poly (ADP-ribose) polymerase: Early involvement in glutamate - induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells / C. Cusi, H. Suzuki, D. Milani // J. Neurosci. Res. – 1994. - Vol. 39, N 1. - P. 38-46.
231. Coles A.J. CAMMS223 Alemtuzumab vs interferon beta 1a in early multiple sclerosis / A. J. Coles, D. Compston, K. W. Selmaj // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359. – P. 1786—1801.
232. Coles A. J. Alemtuzumab versus interferon β -1a in early relapsing-remitting multiple sclerosis: post-hoc and subset analyses of clinical efficacy

- outcomes / A. J. Coles, E. Fox, A. Vladic // *Lancet Neurol.* – 2011. – Vol. 10. – P. 338—348.
233. Comi G. Fatigue and pain in multiple sclerosis / G. Comi // Teaching course “Multiple sclertosis and CNS inflammation”, 7th Congress of EFNS, 30.08-2.09.2003. – P. 39.
234. Cruccu G. Treatment of painful neuropathy / G. Cruccu // *Curr. Opin. Neurol.* – 2007. – Vol. 20, N 5. – P. 531–535.
235. Compston A. Multiple sclerosis / A. Compston, A. Coles // *Lancet.* – 2008. – Vol. 372. – P. 1502-1517.
236. Costelloe L. Secondary autoimmune diseases following alemtuzumab therapy for multiple sclerosis / L. Costelloe, J. Jones, A. Coles // *Expert Rev. Neurother.* – 2012. – Vol. 12. – P. 335—341.
237. Dalton C. Effects of natalizumab on gadolinium enhancing lesions to T1 hypointenss lesions in relapsing multiple sclerosis / C. Dalton, K. Miszkiel, G. Barker // *J. Neurol.* – 2001. – Vol. 251. – P. 407—413.
238. D’Amour F.E. A method for determining loss of pain sensation / F.E. D’Amour, D.L. Smith // *J. Pharmacol. Exp.Ther.* – 1941. – Vol. 72. – P. 74-79.
239. Degano A.L. Passive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats: dissociation of clinical symptoms and biochemical alterations / A. L. Degano, G. A. Roth // *J. Neurosci. Res.* – 2000. – Vol. 59, N 2. – P. 283–290.
240. Design, synthesis and evaluation of a series of non-steroidal anti-inflammatory drug conjugates as novel neuroinflammatory inhibitors / Z. Xu, J. Wu, J. Zheng [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2015. – Vol. 25, N 2. – P. 528-537.
241. De Stefano N. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability / N. De Stefano, S. Narayanan, G. S. Francis // *Arch. Neurol.* - 2001. - Vol. 58. - P. 65-70.

242. Dhib-Jalbut S. Immunology of multiple sclerosis: A critical review / S. Dhib-Jalbut, D. Mc Farlin // Epidemiology. – 1993. – N4. – P. 464-470.
243. Ding M. Antisense knockdown of inducible nitric oxide synthase inhibits induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL. J. mice / M. Ding, M. Zhang, J. L. Wong // J. Immunol. – 1998. – Vol. 160, N 6. – P. 2560 – 2564.
244. Dissolution Methods, Food and Drug Administration [Электронный ресурс]: Режим доступа – http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.sfm?PrintAll=1/
245. Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain / P. Kasa, H. Papp, P. Jr. Kasa, I. Torok // Neuroscience. – 2000. – Vol. 101, N 1. – P. 89–100.
246. Drug Bank [Электронный ресурс]: Режим доступа – <http://www.drugbank.ca/drugs/>
247. Dzyak L.A. Pathogenetic aspects of multiple sclerosis / L. A. Dzyak // Neuro News. Neuropsychiatry neuropsychiatry.- 2013. – Vol. 4. – P. 27-34.
248. Eddy N. B. Synthetic Analgesics: Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines / N.B. Eddy, D. Leimbach // J.. Pharmacol. Exp. Ther. – 1953. – Vol. 107. – P. 385-389.
249. Effects of conventional anticonvulsant drugs on generalized tonic-clonic seizures in Noda epileptic rats / M. Inoue, A. Yamamoto, Y. Kaneko [et al.] // Epilepsy Res. – 2014. – Vol. 108, N 7. – P. 1158 – 1167.
250. Estimation antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of lipoic acid / E. Zvereva, L.N. Zalyalyutdinova, R. Zverev, R. Garaev // Fundamental pharmacology and pharmacy – clinical practice // Materials of the 2nd Russian-

- Chinese international scientific conferences on pharmacology. – Perm, 2006. – P. 65–67.
251. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasbourg: Council of Europe. – 1986. – N 123. – 52 p.
 252. Fassas A. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study / A. Fassas // Bone Marrow Transplant. – 1997. – Vol. 20. – P. 631-638.
 253. Ferger D. Determination of intracellular Ca concentration can be a useful tool to predict neuronal damage and neuroprotective properties of drugs / D. Ferger, J. Krieglstein // Brain Res. - 1996. - Vol. 732. - P. 87-94.
 254. Ferrante R. J. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis / R. J. Ferrante, S. E. Browne, L. A. Shinobu // J. Neurochemistry. – 1997. - Vol. 69, N 5. – P. 2064–2074.
 255. Ferrari G. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells / G. Ferrari // J. Neurosci. - 1995. - Vol. 15, N 4. - P. 2857-2866.
 256. Foong J. Neuropsychological deficits in multiple sclerosis after acute relapse / J. Foong // Neurol. Neurosurg. Psychiatr. - 1998. - Vol. 64, N 4. - P. 529-532.
 257. Fox E. J. New treatments and treatment goals for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis / E. J. Fox, R. W. Rhoades // Curr. Opin Neurol. – 2012. – Vol. 25, Suppl. 1. – P. 11—19.
 258. Fujimori H.J. Psychopharmacologia. - №7. – Цит. по Биоскрининг: лекарственные средства / под ред. А.В. Стефанова. – Киев : Авиценна, 1998. – 16 с.
 259. Futaki N. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and cyclooxygenase inhibitory effects of a non-steroidal anti-inflammatory agent, Lornoxicam /

- N. Futaki, S. Takahashi, T. Kitagawa // *Jap. Pharmacology Therapeutics*. – 1997. – Vol. 25, N 4. – P. 55–71.
260. Gilgun-Sherki Y. Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of multiple sclerosis / Y. Gilgun-Sherki, H. Panet, E. Melamed // *Brain. Res.* – 2003. – Vol. 989, N 2. – P. 196-204.
261. Gilgun-Sherki Y. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy / Y. Gilgun-Sherki, E. Melamed, D. Offen // *J. Neurology*. – 2004. – Vol. 251, Issue 3. – P. 261-268.
262. Giuliani F. Immune-mediated neurodegeneration and neuroprotection in MS / F. Giuliani, V. W. Yong // *Int. MS. J.* – 2003. – N 10. – P. 122–130.
263. Gonzalez M.E. Antioxidant systemic effect of short-term Cerebrolysin administration / M. E. Gonzalez, L. Francis, O. Castellano // *J. Neurol. Transm.* - 1998. - Vol. 53. - P. 333-341.
264. Gusev E.I. The impact of microcirculation dysfunction on the clinical presentations of multiple sclerosis in patients above 45 years and the possible ways of correction of the vascular pathology / E. I. Gusev, A. N. Boiko, E. V. Kolyak // *Zhurnal nevrologii i psikhatrii im. S. S. Korsakova*. – 2008. – Vol. 108, N 5. – P. 25-31.
265. Halliwell B. *Molecular Biology of free Radicals in Human Diseases* / B. Halliwell. – London : St. Lucia: OICA, 1999. - 410 p.
266. Hansson P. *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment, Progress in Pain Research and Management*. Vol. 21 / P. Hansson, H. Fields, R. Hill. - Seattle, WA: IASP Press, 2001. — 283 p.
267. Hayashi J.-I. Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects / J.-I. Hayashi, S. Ohta, Y. Kagawa // *J. Biol. Chem.* – 1994. - Vol. 269. - P. 6878-6883.

268. Hohlfield R. Neuroprotection in multiple sclerosis / R. Hohlfield, L. Kappos. - Cambridge Med.Pub, 2004. - 54 p.
269. Hunskar S. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics / S. Hunskar, O. G. Berge, K. Hole // Behavioural Brain Res. – 1986. – Vol. 21. – P. 101–108.
270. Helwick C. Biomarkers may predict progression in MS / C. Helwick // Medscape. - 2016 (http://www.medscape.com/viewarticle/859376#vp_1).
271. James L. C. A structure of the therapeutic antibody CAMPATH-1H fab in complex with synthetic peptide antigen / L. C. James, G. Hale, H. Waldmann // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 289. – P. 293—301.
272. Jawahar R. A. A systematic review of pharmacological pain management in multiple sclerosis / R. A. Jawahar, U. Oh, S. Yang, K. L. Lapane // Drugs. – 2013. – Vol. 73, N 15. – P 1711-1722.
273. Jiménez-Jiménez F. Cerebrospinal fluid carnitine levels in patients with Parkinson's disease / F. Jiménez-Jiménez, J. Rubio, J. Molina // J. Neurol/Sci. – 1997. – Vol.145, N 2. – P. 183-185.
274. Jones J. L. Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity / J. L. Jones, J. M. Anderson, C.-L. Phuah // Brain. – 2010. – Vol. 133. – P. 2232—2247.
275. Kalman B. Cytokine therapy / B. Kalman, F.D. Lublin // Immunotherapy in Neuroimmunologic Diseases. – London: Martin Dunitz, 1998. – P. 47-54.
276. Khan O. A. A prospective open label treatment trial to compare the effect of IFN- β 1a (Avonex), IFN- β 1b (Betaferon) and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing - remitting multiple sclerosis / O. A. Khan, A. C. Tselis, J. A. Kompolz // Eur. J. Neurol. – 2001. – N 8. – P. 141-148.
277. Klotz L. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in multiple sclerosis. A focus on alemtuzumab / L. Klotz, S. G. Meuth, H. Wiendl // Clin. Immunol. – 2012. – Vol. 142. – P. 25—30.

278. Koenig H. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown / H. Koenig, J. J. Trout, A. D. Goldstone // *Brain Res.* – 1992. – Vol. 588, N 2. – P. 297-303.
279. Koçkaya E. A. Pathological and biochemical effects of therapeutic and supratherapeutic doses of celecoxib in Wistar albino male rats / E.A. Koçkaya, G. Selmanoglu, K. Kısmet // *Drug Chem. Toxicol.* – 2010. – Vol. 33, N 4. – P. 410-414.
280. Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair / H. Lassmann // *Current Opin. Neurol.* – Vol. 1, N 3. – P. 242–247.
281. Lee H. J. Citicoline protects against cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion / H. J. Lee, J. S. Kang, Y. I. Kim // *J. Clin. Neurol.* – 2009. – Vol. 5, N 1. – P. 33–38.
282. Li D. K. B. Analysis Research Group Spectrinis Study Group. Randomized controlled trial of interferon b-1a in secondary progressive MS MRI results / D. K. B. Li, G. J. Zhao, D. W. Pati // *Neurologi.* – 2001. – Vol. 56. – P. 1505-1513.
283. Malik O. Fast Facts: Multiple sclerosis / O. Malik, A. Donnelly, M. Barnett. – Oxford: Health Press limited, 2014. - 136 p.
284. Matute C. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases / C. Matute, E. Alberdi, M. Domercq // *Trends Neurosci.* – 2001. – Vol. 24, N 4. – P. 224-230.
285. McRoberts W.P. Effect of a novel fixation method for spinal cord stimulators / W. P. McRoberts, P. Wu, I. Bentley // *Neuromodulation: Technology Neural. Interface.* – 2013. – Vol. 16, N 5. – P. 449-453.
286. Menge T. Themonoclonal antibody as a new therapy option for multiple sclerosis — hopes and risks / T. Menge, B. C. Kieseier, C. Warnke. – 2012. – Vol. 83. – P. 487—501.

287. Morrison J. D. Physical activity and cognitive function in adults with multiple sclerosis: an integrative review / J. D. Morrison, L. Mayer // *Disabil. Rehabil.* - 2016. – Vol. 10. – P. 34-39.
288. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response / M. Shibata, T. Ohkubo, H. Takahashi // *Pain.* – 1989. – Vol. 38. – P. 347 – 352.
289. Morphological changes of parotid glands following adjuvant arthritis and ibuprofen treatment in rats / C. Mourouzis, T. Saranteas, M. Tsamouris, C. Tesseromatis // *Inter. J. Oral. Maxillofac. Surg.* – 2003. – Vol. 32, N 1. – P. 69–73.
290. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy / V. Siffrin, J. Vogt, H. Radbruch [et al.] // *Trends. Neurosci.* – 2010. – Vol. 33, N 4. – P. 202-210.
291. Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013: Mapping multiple sclerosis around the world (<http://www.msif.org/about-ms/publications-and-resources/atlas-of-ms-2013.aspx>).
292. Multiple sclerosis / A. Nylander, D.A. Hafler [et al.] // *J. Clin Invest.* – 2012. – Vol. 122, N 4. – P. 1180-1188.
293. Myofascial pain: an open study on the pharmacotherapeutic response to stepped treatment with tricyclic antidepressants and gabapentin / Y. Haviv, A. Rettman, D. Aframian, Y. Sharav [et al.] // *J. Oral. Facial. Pain. Headache.* – 2015. – Vol. 29, N 2. – P. 144-151.
294. Nefedov A. A. Experimental analysis of neuroprotective agent in cognitive deficiency development in the modeling of multiple sclerosis / A.A. Nefedov, O. V. Khomiak, E. Y. Kovalenko // *Abstract book 8 International Scientific Interdisciplinary Conference, 14-15 may 2015.* – Kharkiv, 2015. – P. 198.
295. Nefedov A. A. Pharmacological Analysis of Neuroprotective Action of Methylprednisolone with Citicoline in Conditions of Experimental Allergic

- Encephalomyelitis / A. A. Nefedov, I. V. Mamchur, A. V. Abramov // *Biological Markers Guided. Therapy.* – 2016. – Vol. 3, N 1. – P. 115-124.
296. Nefedov A. Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / A. Nefedov, V. Mamchur // *Modern Science - Moderní věda.* – Praha : Česká republika, Nemoros. - 2015. - N 5. - P. 118-125.
297. Nefedov A. A. Pharmacological Correction of Neurological Disorders in Case of Multiple Sclerosis / A. A. Nefedov, V. I. Mamchur // *Galician Medical J.* – 2015. – Vol. 22, N 4, part 2. – P. 39-41.
298. Nefedov A.A. The pain syndrome in multiple sclerosis / A.A. Nefedov // *Матеріали наук.-практ. конф. «Наукові розробки, передові технології, інновації» (02-05 травня 2014 р.).* – Будапешт, Прага, Київ : КНЛУ, НДІР, 2014. -С. 178-179.
299. Ogawa N. Cholinergic deficits in aged rat brain are corrected with nicergoline / N. Ogawa, M. Asanuma, H. Hirata // *Arch. Gerontol. Geriatr.* – 1993. – Vol. 16, N 2. – P. 103–110.
300. Oral Administration of Pregabalin in Rats before or after Nerve Injury Partially Prevents Spontaneous Neuropathic Pain and Long Outlasts the Treatment Period / R. R. Wang, G. D. Lou, J. Yu [et al.] // *Pharmacology.* – 2016. – Vol. 97, N 5-6. – P. 251–258.
301. Pender M. P. Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis / M. P. Pender // *J. Neuroimmunol.* – 1987. – Vol. 15, N1. – P. 11 – 24.
302. Physical disability, anxiety and depression in people with MS: an internet-based survey via the UK MS Register / K. H. Jones, P. A. Jones, R. M. Middleton [et al.] // *PLoS One.* – 2014. - Vol. 9, N 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
303. Popescu B.F. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand / B. F. Popescu, I. Pinba, C. F. Lacchiseni // *J. Neurology.* – 2014. – N 2. – P.176-179.

304. Porsolt R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // *Nature*. – 1977. – Vol. 266. – P. 730-732.
305. Protective effect of diclofenac towards the oxidative stress induced by paracetamol toxicity in rats / W. Aouacheri, S. Saka, R. Djafer, G. Lefranc // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. – 2009. – Vol. 67, N 6. – P. 619–627.
306. PubChem substance [Электронный ресурс]: Режим доступа – <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
307. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw / S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel [et al.] // *J. Neurosci. Methods*. – 1994. – Vol. 53, N 1. – P. 55–63.
308. Randall L.O. Method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. A. Selitto // *Arch. Inter. Pharmacodyn*. – 1957. – Vol. 111, N 2. – P. 409-419.
309. Ransohoff R. M. Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology/ R. M. Ransohoff // *J. Leukoc. Biol*. – 1999. – Vol. 62, N 5. – P. 645–652.
310. Rao S. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns and prediction / S. Rao // *Neurology*. - 1991. - Vol. 41. - P. 685-691.
311. Rao S. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning / S. Rao // *Neurology*. - 1991. - Vol. 41. - P. 692-696.
312. Reichardt H.M. The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis / H.M. Reichardt, F. Luhder // *Curr. Pharm. Des*. – 2012. – Vol.18, N 29. – P. 4453–4464.
313. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell Biol*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.

314. Santos C. L. Cyclooxygenase-2 inhibition increases gastric tone and delays gastric emptying in rats / C. L. Santos, B.A. Medeiros, R.C. Palheta-Junior // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2007. – Vol. 19, N 3. – P. 225–232.
315. Shmidt T.E. Multiple sclerosis: epidemiology, risk factors, pathogenesis, clinical features and progression (according to the materials of the 29th Congress of ECTRIMS) / T. E. Shmidt // *Neurological J.* - 2014. - Vol. 19, N 1. – P. 49-54.
316. Smith K. J. Demyelization: the role of reactive oxygen and nitrogen species / K. J. Smith, R. Kapoor, P. A. Felts // *Brain. Palhoi.* - 1999. – Vol. 9. – P. 69-92.
317. Steinman L. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis / L. Steinman, S.S. Zamvil // *Ann. Neurology.* – 2006. – Vol. 60, N 1. – P. 12-21.
318. Siniscachi A. Drugs treatment of pain in multiple sclerosis / A. Siniscachi, L. Gallelli, G. De Sarro / *Curr. Clin. Pharmacol.* – 2007 – Vol. 2, N 3. – P. 227-233.
319. Strober L.B. Depression in multiple sclerosis: The utility of common self-report instruments and development of a disease-specific measure / L.B. Strober, P.A. Arnett // *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* – 2015. - Vol. 37, N 7. – P. 722-732.
320. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients / L. Bo, C. Vedeler, H. Nyland [et al.] // *J. Neuropath. Exp. Neurol.* - 2003. – Vol. 62, N 7. – P. 723-732.
321. Sych N.S. Pathogenetic aspects of multiple sclerosis / N.S. Sych // *Ukrainskyi medychnyi chasopys.* – 2012. – Vol. 2. – P. 130-131.
322. Szczucinski A. Infectious agents in the pathogenesis of multiple sclerosis / A. Szczucinski, J. Losy // *Przegl. Epidemiol.* – 2006. – Vol. 60, Suppl. 1. – P. 160-165.

323. Tabakman R. Neuroprotection by monoamine oxidase B inhibitors: a therapeutic strategy for Parkinson's disease? / R. Tabakman, S. Lecht, P. Lasarovici // Bioessays. - 2004. - Vol. 26, N 1. - P. 80-90.
324. Teather L.A. Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats / L.A. Teather, R.J. Wurtman // Learn. Mem. - 2005. - Vol. 12, N 11. - P. 39-43.
325. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis / G. C. DeLuca, K. Williams, N. Evangelo [et al.] // Brain. - 2006. - Vol. 129, Pt. 6. - P. 123-127.
326. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview / H. Lassmann, W. Bruck, C. F. Lucchinetti // Brain. Pathol. - 2007. - Vol. 17, N 2. - P. 210-218.
327. The cyclooxygenase-2 pathway via the PGE₂ EP₂ receptor contributes to oligodendrocytes apoptosis in cuprizone-induced demyelination / S. Palumbo, C. D. Toscano, L. Smith Parente, R. Weigert [et al.] // J. Neurochem. - 2012. - Vol. 121, N 3. - P. 418-427.
328. Trazodone is a Potent Agonist at 5-HT_{2C} Receptors Mediating Inhibition of the N-Methyl-D-Aspartate/Nitric Oxide/Cyclic GMP Pathway in Rat Cerebellum / M. Marcoli, G. Maura, M. Tortarolo, M. Raiteri // J. Pharmacology Experimental Therapeutics. - 2010. - Vol. 285, N3. - P. 983-986.
329. Utilization and patients perception of the effectiveness of pain treatments in multiple sclerosis: a cross-sectional survey / D. M. Ehde, K. N. Alschuler, T. L. Osborne [et al.] // Disabil Health J. - 2015. - Vol. 8. - P. 452-456.
330. Waxman S. G. Sodium channel blockade by antibodies: a new mechanism of neurological disease / S. G. Waxman // Ann. Neurol. - 1995. - Vol. 37. - P. 421-423.

331. Weinshenker B. G. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study / B. G. Weinshenker, B. Bass, G. P. Rice // Clin. Course dDsability. Brain. – 1989. – Vol. 112, Pt. 1. – P. 133-146.
332. Van Amerongen B.M. Multiple sclerosis and vitamin D: an update / B.M. Van Amerongen, C.D. Dijkstra, P. Lips // Eur. J. Clin. Nutr. – 2004. – Vol. 58, N 8. – P.1095-1109.
333. Visser L. H. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of i.v. immune globulins in combination with i.v. methylprednisolone in the treatment of relapses in patients with MS / L. H. Visser, R. Beekman, C. C. Tijssen // Mult. Scler. – 2004. – Vol. 10, N.1. – P. 89-91.
334. Zent C.S. Early treatment of high-risk chronic lymphocytic leukemia with alemtuzumab and rituximab / C. S. Zent, T. G. Call, T. D. Shanafelt // Cancer. – 2008. – Vol. 113. – P. 2110-2118.

ДОДАТОК 1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор

з наукової роботи



ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

професор В.Й. Мамчур

2016р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. **в науково-педагогічний процес**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Мамчур В.Й., проф. Опришко В.І., доц. Дронов С.М.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Медицинские перспективы. – 2015. – Т. XX, №2. – С. 4-11.
2. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGN-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117.
3. Нефьодов О.О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Медицинские перспективы. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-10.
4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» **в науково-педагогічний процес** по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. **в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів** щодо неопіоїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі, раціоналізації нейропротекції при розсіяному склерозу засобами медикаментозного захисту мозку.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

проф. Мамчур В.Й.

Члени комісії:

проф. Опришко В.І.

доц. Дронов С.М.

протокол № 8 від 04. 04 2016 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»
 доцент I.В. Геруш
 « 15 » _____ 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Заморський І.І., проф. , доц. Петрюк А.Є., доц.; ас., к.мед.н. Копчук Т.Г.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
2. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGH-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117.
3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.
4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології Буковинського державного медичного університету в науково-педагогічний процес по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

проф. Заморський І.І.

Члени комісії:

доц. Петрюк А.Є.

ас., к.мед.н. Копчук Т.Г.

протокол № 3 від 15.09 2015 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Директор науково-педагогічної роботи
 Вінницького національного медичного університету
 імені М.І. Пирогова
 професор Ю.Й. Гумінський
 10 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Волощук Н.І., проф. , доц. О.М. Денисюк, доц. О.С. Пашинська

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
2. Нефедов А.А. Опыт применения цитиколина в экспериментальной терапии моделированного аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.2, Т. 4 (121). – С. 165-170.
3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.
4. Нефьодов О.О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій анальгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О. О. Нефьодов, В. Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 1. - С. 35-38.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова в науково-педагогічний процес по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

проф. Волощук Н.І.

Члени комісії:

Доц. О.М. Денисюк

Доц. О.С. Пашинська

протокол № 3 від 5.10. 2015 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор ВДНЗ України «УМСА»

З.д.н.т., проф. В.М. Бобирьов

« 12 » 2015 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н., доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Установа-розробник, автор:** Державний заклад «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», кафедра фармакології і клінічної фармакології, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9, к.мед.н., доцент Нефьодов О.О.

3. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов А.А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза / А.А. Нефьодов, В.И. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №2. – С. 4-11.
2. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGN-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117.
3. Нефьодов О.О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-10.
4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

4. **Де впроваджено:** на кафедрі експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією ВДНЗ України «УМСА» в науково-педагогічний процес за темою: «Фармакологія центральної нервової системи».

5. **Термін впровадження:** березень-грудень 2015 рік.

6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

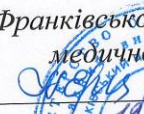
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Протокол № 9 від «21» грудня 2015 р.

Відповідальний за впровадження:

д.мед.н., професор кафедри експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією

Т.О.Дев'яткіна

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Перший проректор
Івано-Франківського національного
медичного університету
професор  Г.М. Ерстенюк
« 08 » _____ 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Купновицька І.Г., проф., доц. Белегай Р.І., доц. Губіна Н.В.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормональної терапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.
2. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіоїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-112.
3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - Р. 118-125.
4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Де і коли впроваджено: на кафедрі клінічної фармакології і фармакотерапії Івано-Франківського національного медичного університету в науково-педагогічний процес по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіоїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

Члени комісії:

 проф. Купновицька І.Г.

доц. Белегай Р.І.

ас. Губіна Н.В.

протокол № 6 від 8 грудня 2015 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор
 з науково-педагогічної роботи
 Запорізького державного
 медичного університету
 професор В.А. Візір
 « 22 » листопада 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Беленічев І.Ф., проф., доц. Бухтіярова Н.В., доц. Павлов С.В.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов О.О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.
2. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-112.
3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderni věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.
4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету в науково-педагогічний процес по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

проф. Беленічев І.Ф.

Члени комісії:

доц. Бухтіярова Н.В.

доц. Павлов С.В.

протокол № 7 від 22.12 2015 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор
 Тернопільського державного медичного університету
 імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
 професор О.Л. Ковальчук

« 20 » _____ 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. у науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Олещук О.М., проф. Посохова К.А., доц. Черняшова В.В.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Держинського, 9.

4. **Джерела інформації:**

1. Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормональної терапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.

2. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-112.

3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.

4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського у науково-педагогічний процес у розділі: «Засоби, які впливають на центральну нервову систему».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Протокол № 3 від 20 жовтня 2015 р.

Голова комісії:

Члени комісії:

О.О. Нефьодов
 [підписи членів комісії]

проф. Олещук О.М.

проф. Посохова К.А.
 доц. Черняшова В.В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор ОНМедУ,
член-кореспондент НАМН України
з.д.н.т. України, д.м.н.,
професор В. Й. Кресюн

2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень Нефьодова О.О.
в практичну діяльність

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».
 2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», 49044, м. Дніпропетровськ, вул. Держинського, 9, доцент, к.мед.н. Нефьодов О.О.
 3. **Джерела інформації:**
 1. Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормонотерапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур : інформ. Лист МОЗ України / ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України». – К., 2015. – 4 л. – Вип. із пробл. – (Фармакологія).
 2. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 4 (116). – С. 108-112.
 3. Nefedov A. Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / A. Nefedov, V. Mamchur // Modern Science – Moderní věda. – Praha, Česká republika, Nemoros. – 2015. – № 5. – Р. 118-125.
 4. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.
 4. **Де і коли впроваджено:** в педагогічний процес кафедри загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету в лекційному курсі та при проведенні практичного заняття за темою: «Антидепресанти. Психостимулятори. Ноотропи. Аналептики» і «Ненаркотичні анальгетики».
 5. **Терміни впровадження:** 2015-2016 навч. рік.
 6. **Результат впровадження:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо створення нових сполук з антидепресантною і анальгетичною активністю.
 6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
- Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної фармакології ОНМедУ, протокол № 2 від „ 21 ” вересня 2015 р.

Відповідальний за впровадження:
професор кафедри загальної та клінічної
фармакології ОНМедУ,
д.м.н., професор

В. В. Годован



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного медичного університету

ім. О.О. Богомольця

Заслужений працівник освіти України,
професор

Я.В. Цехмістер
2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень к.мед.н. доцента кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодова О.О. в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Фармакологічний аналіз знеболення та нейропротекції за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу».

2. **Члени комісії:** проф. Чекман І.С., проф. Горчакова Н.О., доц. Шумейко О.В.

3. **Ким запропоновано:** к.мед.н. доцентом кафедри фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» Нефьодовим О.О., м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9.

4. Джерела інформації:

1. Нефьодов О.О. Вплив знеболюючих засобів на дослідно-орієнтовну функцію ЦНС у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. – 2014. – №4 (46). – С. 135-139.
2. Нефьодов О.О. Зміни анальгетичного потенціалу антиконвульсантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, Т. 1 (122). – С. 161-164.
3. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.
4. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGN-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117.

Де і коли впроваджено: на кафедрі фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця в науково-педагогічний процес по темі: «Фармакологія центральної нервової системи».

Ефект впровадження: застосування результатів наукових досліджень Нефьодова О.О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо неопіїдних анальгетиків, антиконвульсантів та антидепресантів в якості знеболюючих засобів при розсіяному склерозі.

Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:

проф. Чекман І.С.

Члени комісії:

проф. Горчакова Н.О.

доц. Шумейко О.В.

протокол № 8 від 9 грудня 2015 р.

«УТВЕРЖДАЮ»
Первый проректор
УО «Гродненский государственный
медицинский университет»
доцент В.В. Воробьев
« 09 » _____ 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

материалов научных исследований в учебный процесс

1. **Название предложения для внедрения** «Фармакологический анализ обезболивания и нейропротекции в условиях экспериментальных эквивалентов рассеянного склероза».

Члены комиссии: доц. Козловский В.И., доц. Коршак Т.А., доц. Станкевич П.Б.

2. **Кем предложено:** к.м.н. доцентом кафедры фармакологии и клинической фармакологии Государственного учреждения «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины» Нефедовым А.А.

1. **Источники информации:**

1. Нефёдов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефёдов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
2. Нефедов А.А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелимита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза / А.А. Нефедов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014 года, тезисы / Под редакцией С.Б. Середенина, Н.Г. Незнанова, Э.Э. Звартау; - Санкт-Петербург. – 2014. – С. 129.
3. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции болевого синдрома при рассеянном склерозе / А.А. Нефедов // Буковинський медичний вісник. – 2015.- Т. 19, №1 (73). – С. 232-236.
4. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125.
5. Нефёдов О.О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефёдов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с.

Где и когда внедрены: на кафедре фармакологии имени профессора М.В. Кораблева УО «Гродненский государственный медицинский университет» в учебный процесс на лекциях и практических занятиях по теме: «Анальгетические средства» в октябре 2015 г.

Эффект применения: применение результатов научных исследований Нефедова А.А. в научно-педагогическом процессе позволяет расширить знания студентов по применению неопиоидных анальгетиков, антиконвульсантов и антидепрессантов в качестве обезболивающих средств при рассеянном склерозе.

Замечания и предложения: нет.

Глава комиссии:

зав. кафедрой фармакологии имени
проф. М.В. Кораблёва, доцент

Члены комиссии:

доцент

доцент

 В.И. Козловский
 П.Б. Станкевич
 Т.А. Коршак

протокол № 3 от 09.10 2015 г.

Учреждение образования
«Гродненский государственный
медицинский университет»



С.Б. Вольф

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Название предложения о внедрении «Фармакологический анализ обезболивания и нейропротекции в условиях экспериментальных эквивалентов рассеянного склероза».

2. Учреждение-разработчик: Государственное учреждение «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины»

Автор: Нефедов А.А.

3. Источник информации: Нефёдов О.О. Экспериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефёдов, В.Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-10.

Нефёдов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефёдов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

Нефёдов О.О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій анальгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О. О. Нефёдов, В. Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 1. - С. 35-38.

4. Сущность разработки: экспериментальные исследования обезболивающей активности ненаркотических анальгетиков и средств адыювантной терапии (антиконвульсанты и антидепрессанты) на модели электрокожного раздражения корня хвоста крысы с моделированным экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом на фоне терапии метилпреднизолоном позволило показать изменение антиноцицептивной активности исследуемых лекарственных средств при рассеянном склерозе совместно с глюкокортикостероидами.

4. Кем и когда внедрено:

5. Форма внедрения: способ оценки анальгетической активности при рассеянном склерозе внедрён в научно-исследовательскую работу кафедры

фармакологии имени профессора М.В. Кораблёва УО «Гродненский
государственный медицинский университет»

6. Сроки внедрения: ноябрь 2015 г.

7. Результаты внедрения; предложенный способ позволяет в
экспериментальных условиях оценить анальгетическую активность новых
соединений, исследуемых на кафедре, на модели электрокожного
раздражения.

Ответственный за внедрение:

зав. кафедрой фармакологии
имени проф. М.В. Кораблёва
к.м.н., доцент



В.И. Козловский

ДОДАТОК 2

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Нефьодов О.О. Роль імунотерапії у хворих на розсіяний склероз в практиці сімейного лікаря / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, О.І. Корсунська, О.І. Кальбус // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.1 (113). – С. 25-30. *(Особистий внесок дисертанта: пошук наукової інформації, участь у її аналізі і узагальненні, формулювання висновків)*
2. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.2 (114). – С. 205-208. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
3. Нефьодов О.О. Вплив знеболюючих засобів на дослідно-орієнтовну функцію ЦНС у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. – 2014. - №4 (46). – С. 135-139.
4. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-111.
5. Нефьодов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.

6. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции болевого синдрома при рассеянном склерозе (обзор литературы) / А.А. Нефедов // Буковинський медичний вісник. – 2015.- Т. 19, №1 (73). – С. 232-236.
7. Нефедов А.А. Опыт применения цитиколина в экспериментальной терапии моделированного аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.2, Т. 4 (121). – С. 165-170. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
8. Нефьодов О.О. Зміни анальгетичного потенціалу антиконвульсантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, Т. 1 (122). – С. 161-164. *(Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків і подальших перспектив, оформлення статті до друку)*
9. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №2. – С. 4-11. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження, участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків)*
10. Нефьодов О.О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій анальгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - №1(25). - С. 35-38. *(Особистий внесок дисертанта:*

планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)

11. Нефьодов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності РGH-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
12. Нефьодов О.О. Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №3 (44). – С. 10-16. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних джерел, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
13. Нефьодов О.О. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом у тесті «відкрите поле» / О.О. Нефьодов // Одеський медичний журнал. – 2015. - №5 (151). – С. 14-19.
14. Нефьодов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.
15. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції)*

роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)

16. Нефьодов О.О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-9. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
17. Нефьодов О.О. Зміни рухово-дослідницької поведінки тварин під впливом антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. -2015. - №4(54). – С. 131-134.
18. Нефьодов О.О. Порівняльна характеристика болезаспокійливої активності протисудомних засобів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 2 (26). - С. 45-47. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
19. Нефьодов О.О. Нейротропні ефекти антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №6 (46). – С. 28-33.
20. Nefedov A.A. Pharmacological Correction of Neurological Disorders in Case of Multiple Sclerosis / A.A. Nefedov, V.I. Mamchur // Galician Medical Journal. – 2015. – Vol. 22, N 4, part 2. – P. 39-41. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*

21. Нефедов А.А. Оценка эффективности нейропротективной терапии экспериментального аллергического энцефаломиелита в условиях базовой терапии солу-медролом / А.А. Нефедов // Biomedical and Biosocial Antropology. – 2015. - №24. – С. 65-70.
22. Нефьодов О.О. Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому та демієлінізуючої патології / О.О. Нефьодов, В.Б. Ларіонов, М.Я. Головенко, В.Й. Мамчур // Журнал Національної академії медичних наук. – 2015. - Т.21, №3-4. – С. 398-403. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка отриманих даних)*
23. Нефьодов О.О. Оцінка змін рухової та емоційної активності щурів під впливом антиконвульсантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2016. - №1(73). – С. 12-18.
24. Нефедов А.А. Оценка антиноцицептивного потенциала антидепрессантов в терапии невропатической боли, индуцированной экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Т.20, №1 (77). – С. 94-98. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)*
25. Нефедов А. Изучение влияния комбинированного использования метилпреднизолона с цитиколином на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его образований в условиях рассеянного склероза в эксперименте / А. Нефедов, В. Мамчур // Modern Science - Moderní věda. -

- Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2016. - №1. - P. 142-156. (*Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку*)
26. Нефедов А.А. Особенности ультраструктуры фронтальной коры и гиппокампа крыс в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелимита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур, И.В. Твердохлеб // Morphologia. – 2016. – Т.10, №1. – С. 54-61. (*Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження, участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків*)
27. Nefedov Alexander A. Pharmacological Analisis of Neuroprotective Action of Methylprednisolone with Citicoline in Conditions of Experimental Allergic Encephalomyelitis / Alexander A. Nefedov, Vitaly I. Mamchur, Andrey V. Abramov, Nina V. Bukhtiyarova // Biological Markers and Guided Therapy. – 2016. – Vol.3, N1. – P. 115-124. (*Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку*)
28. Нефедов А.А. Применение цитиколина для коррекции ультраструктурных изменений ЦНС, индуцированных экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип.2, Т.2 (129). – С. 235-240. (*Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення результатів експерименту, участь у розробці загальної концепції роботи*)
29. Нефедов А.А. Прогнозирование в экспериментах in silico взаимодействия габапентина с метилпреднизолоном как средств комбинированной терапии демиелинизирующих заболеваний / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур,

- В.Б. Ларионов, В.С. Смандич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. - №2 (48). – С. 67-73. *(Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
30. Нефьодов О.О. Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, В.Б. Ларіонов, С.М. Дронов // Світ медицини та біології. - 2016. - №2(56). – С. 52-58. *(Особистий внесок дисертанта: статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
31. Корсунська О.І. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О.І. Корсунська, О.О. Нефьодов. – Дніпропетровськ: «Літограф», 2015. – 203 с. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
32. Пат. 111354 Україна, МПК А 61 К 31/00, А 61 Р 25/00. Спосіб лікування розсіяного склерозу / Нефьодов О.О., Мамчур В.Й., Дронов С.М., Макаренко О.В.; заявник та патентовласник Нефьодов Олександр Олександрович, Мамчур Віталій Йосипович, Дронов Сергій Миколайович, Макаренко Ольга Володимирівна – № u 201604214 ; заявл. 18.04.16; опубл. 10.11.2016, Бюл. №21. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*
33. Нефьодов О.О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок*

дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка до друку)

34. Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормонотерапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*
35. А. с. 60033 Україна. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О. І. Корсунська, О. О. Нефьодов (Україна). – Заявл. 08.04.2015 ; опубл. 05.06.2015. *(Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
36. Nefedov A.A. The pain syndrome in multiple sclerosis / A.A. Nefedov // Матеріали науково-практичної конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації», 02-05 травня 2014 року. – Будапешт-Прага-Київ, - К.: КНЛУ, НДІР. – С. 178-179.
37. Нефьодов О.О. Фармакотерапевтична корекція больових синдромів при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.», 30-31 травня 2014 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 102-104.
38. Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз терапії болю за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали XV конгресу СФУЛТ, 16-18 жовтня 2014 р., Чернівці-Київ-Чікаго. – С. 365.

39. Нефедов А.А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелимита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза / А.А. Нефедов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014 года, тезисы / Под редакцией С.Б. Середенина, Н.Г. Незнанова, Э.Э. Звартау; - Санкт-Петербург. – 2014. – С. 129.
40. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження ненаркотичного анальгетика мелоксикама на поведінкові реакції у щурів із експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», 23-24 квітня 2015 р. – Суми. – С. 172. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та схеми проведення наукової роботи, виконання експерименту)*
41. Нефьодов О.О. Дослідження анальгетичних властивостей кеторолаку за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу // О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали міжнародної науково-методичної конференції «Актуальні питання медицини», 27 березня 2015 р. – Дніпропетровськ. – С. 171-173.
42. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження знеболюючого потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов експериментальної патології ЦНС / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик, В.В. Кривошей // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів», 24-25 квітня 2015 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 94-95.

43. Нефьодов О.О. Вивчення впливу антиконвульсанта габапентину на поведінкові реакції у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальна та клінічна медицина», 20-22 травня 2015 р. – Київ, 2015. – С. 45-46.
44. Нефьодов О.О. Аналіз впливу цитиколіну на безумовно-рефлекторну активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов // Хист. – 2015. – вип. 17. – С. 378.
45. Нефьодов О.О. Дослідження впливу амітриптиліну на поведінкові реакції в щурів у тесті «відкрите поле» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Матеріали II науково-практичної конференції з міжнародною участю «Природничі читання», 14-17 травня 2015 року. – Чернівці, 2015. – С. 179-180.
46. Нефьодов О.О. Вивчення впливу α -ліпоєвої кислоти на поведінкові реакції у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2015. - №1 (22). – С. 151.
47. Нефьодов О.О. Дослідження впливу лорноксикаму на дослідно-орієнтовану функцію ЦНС у щурів за умов експериментального моделювання розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015», 14-15 травня 2015 р. – Запоріжжя. – С. 30.
48. Nefedov A.A. Exsperimental analysis of neuroprotective agent in cognitive deficiency development in the modeling of multiple sclerosis / A.A. Nefedov, O.V. Khomiak, E.Y. Kovalenko // Abstract book 8 International Scientific

Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, 14-15 may 2015. – Kharkiv. – 2015. – P. 198.

49. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу парацетамолу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я», 30 квітня 2015 року. – Київ. – С. 47-48.
50. Нефьодов О.О. Особливості антиноцицептивних ефектів антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23-24 жовтня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 98-100.
51. Нефьодов О.О. Розсіяний склероз: патогенетичні механізми розвитку та особливості перебігу в експерименті / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, С.М. Дронов, О.В. Кривошей // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління», 1-9 листопада 2015 р. –Будапешт-Прага-Київ, 2015. – С. 159-166.
52. Нефьодов О.О. Місце антиконвульсанта топірамата у знеболенні при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії», 9-10 листопада 2015 р. – Вінниця, 2015. – С. 193-194.
53. Нефьодов О.О. Дослідження місця габапентину та прегабаліну при ноцицепції за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О.

- Нефьодов // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», 22-23 жовтня 2015 р. – К.: вид-во «Мегапринт», 2015. – С. 81-82.
54. Нефедов А.А. Изучение анальгетического потенциала антидепрессанта в терапии невропатического болевого синдрома в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, Н.А. Ковтуненко, Л.А. Легкая // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини», 18-19 грудня 2015 року. – Одеса. –С. 120-122.
55. Нефьодов О.О. Експериментальна оцінка впливу антиконвульсантів габапентину та прегабаліну на поведінкові реакції в тесті «відкрите поле» за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції розвитку медичної науки та медичної практики», 25-26 грудня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 140-141.
56. Нефьодов О.О. Фармакокінетичні особливості вибору знеболюючого засобу за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, С.М. Дронов, В.С. Смандич, О.В. Кулик // Матеріали XXXIII Всеукр. наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», 08 квітня 2016 року. – Х. : НФаУ, 2016. – С. 143-144.
57. Нефьодов О.О. Вивчення біофармацевтичної взаємодії антиконвульсанта з глюкокортикостероїдом за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, О.В. Кулик // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з

міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», 24-25 листопада 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 59-60.

ДОДАТОК 3

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Матеріали дисертаційної роботи представлені на:

- Науково-практичній конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації» (Будапешт-Прага-Київ, 2014),
- XV конгресі СФУЛТ (Чернівці-Київ-Чікаго, 2014),
- Всеросійській конференції с міжнародною участю, присвяченої 90-річчю з дня народження академіка АМН СРСР Артура Вікторовича Вальдмана «Інновації в фармакології: від теорії до практики» (Санкт-Петербург, 2014),
- III Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 2015),
- II Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Пріоритети та перспективи молодіжної науки» (Чернівці, 2015),
- III Міжнародній науково-практичній конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління» (Будапешт-Прага-Київ, 2015),
- Підсумковій LVIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченої пам'яті ректора, члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука) (Тернопіль, 2015),

- Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015» (Запоріжжя, 2015),
- Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я» (Київ, 2015),
- VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії» (Вінниця, 2015),
- III Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015),
- Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Одеса, 2015),
- XXXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2016),
- Науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016).