

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Павлюка Івана Володимировича на тему «НЕЙРОПРОТЕКТИВНА ДІЯ СПОЛУК L-ЛІЗИНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ АЛКОГОЛІЗМІ», яка представлена до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.550.01 в ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія

Актуальність теми дисертації

Робота, що рецензується, розвиває науковий напрямок – створення нових лікарських препаратів- нейропротекторів для лікування захворювань при моделюванні гострої та хронічної алкогольної інтоксикації. На жаль, в Україні практично припинилося створення нових лікарських засобів. Це пов'язано, передусім, з величезним обсягом необхідних наукових досліджень, які зараз практично неможливо виконати. Тому розробка нових лікарських препаратів та їх лікарських форм є дуже актуальною проблемою як з наукової, так і з практичної точки зору.

Як відомо систематичне вживання алкоголю призводить до пошкодження всіх внутрішніх органів. А особливої шкоди зазнає нервова система. Відомо, що під дією алкоголю в тканинах головного мозку спостерігається виражена гіперемія, розширення капілярів, дистрофічні зміни гліозних клітин в корі, амонієвому розі та підкіркових утвореннях, а також руйнування клітин мозочка. Хронічний алкоголізм може призводити до розвитку комплексу психічних, мозочкових, екстрапірамідних і вегетосудинних розладів (токсична енцефалопатія). Спостерігаються різноманітні порушення свідомості і психічних функцій, від симптомів збудження ЦНС до пригнічення. Під час перетворення продуктів деградації алкоголю з'являються вільні радикали, які є геномо- і цитотоксичними і призводять до пошкодження різноманітних біологічних структур. Вільні радикали є високоактивними молекулами або атомами, що мають неспарені електрони

на зовнішній орбіталі, що не приймають участі в утворенні хімічного зв'язку. Тому важливе застосування таких препаратів, як ліганди, нейропептидних рецепторів, що здатні регулювати апоптоз, синтез ферментів, експресію транскрипційних факторів, регенеруючи мітохондріальну ДНК, і ферментів, які каталізують енергетичні реакції. Все вищесказане підкреслює особливу актуальність подальшого дослідження біохімічних, молекулярних аспектів патогенезу алкоголізму, а також активний пошук нових високоефективних церебропротективних та нейропротективних лікарських препаратів для комплексного лікування алкоголізму.

Тому дослідження Павлюком І. В. нейропротективних властивостей сполук L-лізину та розробка нових нейропротективних лікарських засобів для лікування хронічних алкогольних захворювань – є надактуальним.

Мета дисертаційної роботи полягає в вивченні нейропротективних властивостей сполук L-лізину та в обґрунтуванні об'єктивних можливостей використання найбільш активної сполуки, на основі експериментально встановлених механізмів позитивного впливу на морфологічні, біохімічні і функціональні порушення головного мозку, в якості ефективного засобу із зазначеною дією в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

Для досягнення поставленої мети дисертантом були вирішені наступні завдання:

- Виявлено найбільш активну сполуку з нейропротективною активністю серед L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату під час гострої алкогольної інтоксикації та визначити її ED₅₀ та LD₅₀.

- Вивчено вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники неврологічних порушень (за шкалою С.Р. McGraw) і когнітивно-мнестичних порушень (тест УРПУ і відкрите поле) при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації.

- Вивчено вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на морфо-функціональні характеристики нейронів СА-1-зони гіпокампа (площа, густина, вміст РНК нейронів та глії, вміст апоптично змінених нейронів і вміст Vcl_2) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

- Вивчено вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники оксидативного та нітрозуючого стресу (NOS, нітротирозин, стабільні метаболіти NO, СОД, каталаза, АФГ, КФГ) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

- Вивчено вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на показники енергообміну (АТФ, АДФ, АМФ, лактат, піруват, малат, ГАМК-шунт) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

- Вивчено вплив найбільш активної сполуки при лікувальному і профілактичному введенні на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів судин і капілярної сітки головного мозку (щільність, площа, вміст РНК і експресія VEGF) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота Павлюка І. В. виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP₇₀/HIF-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

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

Проведений аналіз літературних джерел обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації, з експериментальним обґрунтуванням для подальшого вивчення найбільшактивної сполуки - Анігіоліну з метою створення на його основі нейропротективного препарату для лікування алкогольних захворювань.

Якщо виходити із допущення, що будь-яке наукове дослідження залежить від використаних методів, то зазначимо, що при виконанні дисертаційної роботи Павлюк І.В. використав сучасні методи дослідження, а саме фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, гістоімунохімічні, математичної статистики і системного аналізу.

Дисертаційна робота виконана на сучасному технологічному та аналітичному обладнанні, з використанням валідованих методів дослідження.

Висновки, які наведені після кожного розділу та загальні висновки витікають з результатів експериментальних досліджень. Наукова новизна, практична значущість та рекомендації, що сформульовані в дисертації, базуються на фактичному експериментальному матеріалі.

Результати наукових досліджень Павлюка І.В. обговорювались на вітчизняних та міжнародних науково-практичних конференціях та з'їздах.

Наукова новизна отриманих результатів

До новизни наукових положень Павлюка І. В. слід віднести отримані новітні дані про нейропротективні властивості сполук L-лізину - L-лізину есцинату, L-лізину гідрохлориду, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду та (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) на моделі гострої алкогольної інтоксикації. Нейропротективна дія сполук була направлена на відновлення поведінкових реакцій, зменшення неврологічних порушень, а також на зниження оксидативного та нітрозуючого стресів і нейроапоптозу. Павлюком І. В. становлено, що

Ангіолін за силою нейропротективної дії перевершує інші досліджувані сполуки L-лізину та референс-препарат Мілдронат. При моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації при внутрішньошлунковому введенні, вперше виявлена висока нейропротективна активність Ангіоліну, показано його перевагу при порівнянні з референс-препаратом. Дисертантом було встановлено, що Ангіолін при лікувальному і профілактичному режимах введення на умовах хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення експресії ендотеліального фактора росту, щільності ендотеліоцитів судин головного мозку, аеробної продукції АТФ та щільності нейронів СА-1-зони гіпокампа, гальмування оксидативного стресу та нейроапоптозу, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2, підвищення РНК в нейронах СА1-гіпокампа і, як наслідок, зменшення неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Наукова новизна виконаних досліджень підтверджена двома патентами України на винахід.

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

Дисертантом були отримані результати експериментального дослідження нейропротективної дії (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) та увійшли до звіту, який представлений в ДУ «Державний експертний Центр МОЗ України» з метою створення нового лікарського препарату.

Новизна досліджень підтверджена патентами України (№ 106867 від 10.10.2014 та № 111462 від 25.04.2016). Результати дослідження впроваджені в педагогічний процес і наукову роботу Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської державної медичної академії, Буковинської державної медичної академії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»; кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету; кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету; кафедри загальної та медичної фармакології Одеського національного медичного університету, а також до

наукового процесу ДП «Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції» МО України.

Як видно з вищевказаного, наукова новизна та практична значимість дисертаційної роботи Павлюка І. В. не викликають сумніву.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Результати дисертаційної роботи достатньо висвітлені у наукових публікаціях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, 6 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України на винахід № 106867 від 10.10.2014, № 111462 від 25.04.2016.

В усіх виданнях широко та повно представлені основні положення дисертаційної роботи.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи і відображає обсяг, наукову новизну та практичне значення проведених досліджень.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків

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

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках комп'ютерного тексту (основний обсяг становить 151 сторінку) та складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 5 розділів особистих досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Робота проілюстрована 7 рисунками, 37 таблицями. Список використаних джерел містить 354 найменування, з них 280 кирилицею, 74 латиницею.

У вступі дисертантом доведена актуальність теми, вказано зв'язок роботи з науковими програмами, мета та завдання дослідження, наукове і практичне значення одержаних результатів, охарактеризовано об'єкт і предмет дослідження, показано особистий внесок здобувача та результати апробації дисертації.

У першому розділі «Огляд літератури. Сучасна стратегія нейропротекції при алкогольній хворобі» (літературний огляд) дисертантом узагальнені та проаналізовані сучасні дані наукової літератури щодо рівня алкоголізації населення в країнах світу, пострадянського простору й, у тому числі, в нашій Державі та наслідків хронічного зловживання алкоголю. Павлюком І. В. було проаналізовано стан та якість сучасних нейропротективних препаратів, а також обґрунтовано перспективність вивчення нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації.

В другому розділі «Матеріали і методи дослідження» дисертантом обґрунтовано загальну методологію досліджень; запропоновано план експериментальних досліджень, а також описано характеристики об'єктів і методів дослідження, наведено матеріали та обладнання, що використовувалися при виконанні експериментальної частини дисертаційної роботи.

Третій розділ - «Оцінка нейропротективної дії похідних L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації», присвячений порівняльному дослідженню сполук L-лізину, що проявляють, в різного ступеня вираженості, нейропротективну дію на моделі гострої алкогольної інтоксикації. Павлюком І. В. встановлено, що нейропротективна дія у похідних L-лізину спрямована на відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові подразники, взяття їх в руки, переверталися на живіт, починали самотійно пересуватися), зменшення неврологічних порушень, а також на гальмування оксидативного і нітрозуючого стресу. Дві сполуки L-лізину за силою нейропротективної дії, а саме - (S) -2,6-

діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид достовірно перевершують ефективність референс-препарату мілдронату, а два похідних - L-лізину гідрохлорид і L-лізину ессцінат - можна порівняти з ним. Найактивнішим серед всіх досліджуваних сполук виявився Ангіолін. Введення Ангіоліну тваринам з гострою алкогольною інтоксикацією одноразово в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі - підвищує щільність нейронів СА1-зони гіпокампу, збільшує вміст в них РНК і знижує кількість нейронів з ознаками апоптозу, а також призводить до відновлення орієнтовно-дослідницької активності. При моделюванні гострої алкогольної інтоксикації встановлена ЛД₅₀ Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні щурам - 15000 мг/кг та мишам - 10309 мг/кг, та його ефективна доза при внутрішньошлунковому введенні 100 мг/кг. Вчі вищевказані результати досліджень експериментально обґрунтовують перспективність подальших досліджень нейропротективних властивостей Ангіоліну на моделі хронічної алкогольної інтоксикації.

В четвертім розділі дисертаційної роботи «Нейропротективна і ендотеліопротективна дія таблеток «Ангіолін» при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального і профілактичного режиму введення» дисертантом були представлені результати досліджень при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації, яка призводила до стійких порушень ЦНС у експериментальних тварин.

Павлюком І. В. встановлено, що призначення Ангіоліну призводило до зниження розвитку неврологічного та когнітивного дефіциту у тварин - і до поліпшення показників орієнтовно-дослідницької діяльності на 151-321 %%, збільшення латентного періоду умовної реакції пасивного уникнення на 134 %, зменшення прояву неврологічної симптоматики (на 3 бали за McGrow).

Також виявлено, що курсове призначення Ангіоліну в лікувальному і профілактичному режимах введення щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією зменшувало ступінь вираженості енергодефіциту за рахунок

інтенсифікації окислювальної продукції АТФ, посилюючи активність дикарбонової ділянки циклу Кребса; знижувало «витрачання» інтермедіатів ГАМК-шунта в енергообміні, підвищувало концентрацію гальмівних амінокислот; знижувало активність анаеробного гліколізу і розвиток лактатацидозу в головному мозку алкоголізованих тварин.

В наступних наукових дослідженнях дисертантом було підтверджено нейропротективну дію Ангіоліну і при морфологічних дослідженнях нейронів зони СА-1 гіпокампу щурів, що перенесли хронічну алкогольну інтоксикацію. А саме введення Ангіоліну призводило до: збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампу на 49,3%; зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 38%; підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2 на 460%.

Подальше курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі кори головного мозку на 38% і судинної стінки судин мозку на 42%, підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах на 37% і 41% відповідно, а також збільшувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів в цих судинах на 47% і 142% відповідно, а також призводило до підвищення експресії фактору росту ендотелію (VEGF) в капілярній сітці і в судинах мозку на 88% і 367% відповідно.

П'ятий розділ дисертаційної роботи «Аналіз та обговорення отриманих результатів» був присвячений аналізу отриманих результатів досліджень. На підставі проведених досліджень було виявлено сполуку L-лізину – (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) з найбільш вираженою нейропротективною дією в умовах алкогольної інтоксикації. Павлюком І.В. визначено, що нейропротективна дія Ангіоліну в умовах хронічної алкогольної інтоксикації направлена на нормалізацію енергетичного метаболізму головного мозку, гальмування оксидативного і нітрозативного стресу, гальмування нейроапоптозу в СА1-гіпокампі та активацію експресії bcl-2, протекцію ендотеліоцитів судин головного мозку

та підвищення експресії васкулярного ендотеліального фактору росту, що, призводить до поліпшення неврологічного статусу і поведінкових реакцій піддослідних щурів. Механізм зазначеної дії обумовлений властивостями 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату активувати компенсаторні мітохондріальні-цитозольні шунти енергії, інактивувати цитотоксичні форми NO, гальмувати NO-залежний механізм нейроаптозу і підвищувати біодоступність цього трансмітера іздатністю метаболіту L-лізину - піпеколієвої кислоти обмежувати трансмітерний аутокоідоз; також за рахунок антиоксидантних властивостей Ангіолін здатний впливати на АФК- і SH-SS-залежні механізми Red / Oxi регуляції і транскрипції, що може призводити до підвищення експресії VEGF і ряду цитопротективних білків.

Зауваження:

1. В огляді літератури мало інформації про нейропротективну дію референс-препарату Мілдронат при алкогольних захворюваннях.
2. У розділі «Матеріали і методи дослідження» немає інформації про попередній відбір щурів для експерименту з урахуванням їх індивідуальної резистентності до алкоголю.
3. Для повної оцінки нітросидергічної системи головного мозку необхідно на тлі загальної активності NOS також визначати експресію nNOS і iNOS.

Ці зауваження і побажання не є принциповими, не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи та загальну позитивну оцінку дисертації, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Вашими дослідженнями встановлено, що Ангіолін при профілактичному і, що особливо важливо, при лікувальному режимі введення тваринам з хронічною алкогольною інтоксикацією знижував тривожність, агресивність, збудливість тварин. Який механізм подібної дії? Чим Ангіолін вигідно відрізняється в цьому відношенні від бенздіазепінових анксиолітиків?

2. Вами встановлено позитивний вплив Ангіоліна на енергетичний метаболізм головного мозку тварин після хронічної алкогольної інтоксикації. Що первинне в цій дії - мітопротекція або активація дегідрогеназ циклу Кребса на три- і дикарбонових ділянках?

3. Яка частина молекули Ангіоліна: 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат або L-лізин впливає на ендотеліоцити судин головного мозку? Поясніть механізм ендотеліопротективної дії Ангіоліна.

Висновки

Дисертаційна робота Павлюка І.В. «Нейропротективна дія сполук L-лізину при хронічному алкоголізмі», є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання. За актуальністю, об'єднання роз'ємом, використанням методів досліджень, новизною отриманих даних дисертація є завершеним науковим дослідженням та відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року, а її автор, Павлюк Іван Володимирович, заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Професор кафедри фармакології,
завідувач Навчально-науково-дослідної лабораторії з
доклінічної оцінки лікарських засобів
та біологічно-активних речовин «Фармадар»
д. мед. н., професор

О. А. Ходаківський



Діпис
завіряю
ст-мен
відділу кадрів
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.П.Львівського
О. А. Ходаківський
« 18 » 05 2018 р