

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Семененко Святослава Ігоревича: «Фармакологічне обґрунтування використання модулятора NMDA-рецепторів в якості церебропротектора при черепно-мозковій травмі (експериментальне дослідження)», подану на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія

Актуальність теми дисертації

Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є однією з найактуальніших проблем клінічної неврології та нейрохірургії. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у багатьох країнах спостерігається постійне збільшення кількості випадків ЧМТ. Це пов'язано із широким впровадженням технічних засобів у побуті та на виробництві, а також з великим поширенням автомобільного транспорту. У результаті проведеного ретроспективного епідеміологічного дослідження було показано, що в країнах Євросоюзу щорічно реєструється від 150 до 300 випадків ЧМТ на 100 000 населення. У США частота звернень з приводу ЧМТ до медичних установ протягом року, за оцінками різних авторів, коливається від 175 до 400 осіб на 100 000 населення, з них близько 85 осіб госпіталізують.

У зв'язку з бойовими діями на території України та збільшенням кількості військовослужбовців, які отримали закриту ЧМТ, що призводить до втрати боєздатності особового складу ЗСУ, актуальною є оптимізація підходів до медикаментозної нейропротекції. Наведені факти, а також різноманітність клінічних проявів і тяжкості перебігу ЧМТ зумовлюють необхідність розроблення стратегій науково обґрунтованих підходів до її патогенетичного лікування, що ґрунтується на вивченні різних аспектів її патогенезу. У патогенезі ЧМТ важливу роль відіграють вторинні пошкодження тканини головного мозку, передусім церебральна ішемія, внаслідок чого формуються порушення енергетичного метаболізму, вуглеводного обміну, гіперактивація вільнорадикальних процесів, що ініціюють процеси переокиснення. Так,

встановлено що патологічні зміни, що відбуваються після ЧМТ, називають ішемічним каскадом, сутність якого зводиться до наступного: зниження доставки O_2 і глюкози викликає негайне розщеплення аденозинтрифосфату (АТФ) для покриття потреб клітин в енергії (триває 2–4 хвилини після повної ішемії). Далі використовується фосфокреатинін, рівень якого в мозку в 3 рази вищий за АТФ, для процесів ресинтезу АТФ з аденозиндифосфатів (АДФ). Розвивається зниження внутрішньоклітинного рН і перехід на анаеробний гліколіз, що веде до підвищення вмісту молочної кислоти, перетворення за допомогою лактату тривалентного заліза на двовалентне. Саме це сприяє утворенню вільних радикалів та окисненню ліпідів клітинних мембран.

Важливим моментом каскаду є підвищення рівня нейротрансмітерів - збуджуючих амінокислот глутамату й аспартату. Аспартат впливає тільки на N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори, які локалізовані в корі й гіпокампі. Глутамат активує три типи рецепторів: NMDA-рецептори, локалізовані в корі й таламусі, АМРА-рецептори, або рецептори до квізквалату, рецептори каїнату, що локалізовані в стріатумі гіпокампа. Активація NMDA-рецепторів сприяє входженню в клітину Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} і H_2O . Активація АМРА-рецепторів і рецепторів каїнату сприяє входженню в клітину Na^+ . Отже, зростання позаклітинної концентрації глутамату веде до загибелі клітин двома шляхами. Перший шлях – при активації глутаматом NMDA-рецепторів розвивається негайна нейротоксичність: при входженні в клітину Na^+ , Cl^- і H_2O виникає клітинний набряк, лізис мембран і клітинна смерть. Другий шлях – у період від 24 до 72 годин після ішемії формується відстрочена нейротоксичність - активація NMDA-рецепторів сприяє входу в клітину іонів Ca^{2+} , у результаті активуються фосфоліпази, протеази, вільні жирні кислоти, утворюються арахідонова кислота й вільні радикали, що веде до окиснення ліпідів і клітинної смерті. Вивчення особливостей перебігу патофізіологічних процесів цереброваскулярних розладів (і гострих, і хронічних) та травматичного пошкодження мозку показало: в основі поширення порушень цілісності клітин і руйнування тканин при різних формах внутрішньочерепних гематом –

механізми апоптозу або некрозу. Сучасна медицина має великий асортимент лікарських засобів для лікування та запобігання наслідкам ЧМТ, але не всі препарати відповідають сучасним вимогам. Тому пошук і розроблення нових високоефективних, безпечних засобів фармакологічного захисту мозку, що відрізняються політропністю фармакодинамічних ефектів, спрямованих на одночасну корекцію різних ланок патогенезу ЧМТ – один із пріоритетних напрямів розвитку фундаментальної та клінічної медицини.

Нині в Україні та світі є чимало препаратів із нейропротекторними властивостями, але немає можливості здійснити мультицентрові рандомізовані плацебо-контрольовані дослідження цих нейропротекторів. При гострій мозковій ішемії, що спричинена ЧМТ, кожен хворий є унікальним випадком зі своїми особливостями та проблемами. З огляду на роль ініціальних механізмів формування нейродеструкції при ЧМТ, а саме, трансмітерний аутокоїдоз, глутаматна ексайтотоксичність та активація глутамат-кальцієвого каскадного механізму, пріоритетним є застосування препаратів первинної нейропротекції. Нині до цієї групи належать модулятори AMPA, NMDA і блокатори нейрональних Ca^{++} каналів. Однак, наразі використовуються блокатори нейрональних Ca^{++} каналів з невеликим за часом терапевтичним вікном, а відомі модулятори AMPA і NMDA були забраковані в клінічних випробуваннях і не застосовуються. Тому розробка і створення нейропротекторів з AMPA- і NMDA-модулюючим механізмом дії є вельми перспективним напрямком у нейрофармакології. У роботах професора ВНМУ ім. Пирогова Олексія Ходаковського вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено високу нейропротекторну ефективність похідного адамантану – 1-адамантилтілокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (Адемол) в умовах ішемії головного мозку, що дає змогу підвищити ефективність лікування серцево-судинних патологій ішемічного генезу. Уперше показано, що адемол, на відміну від класичних первинних нейропротекторів – блокаторів NMDA-рецепторів, не лише перериває реакції глутамат-кальцієвого каскаду, а й індукує базисні механізми адаптації,

нейропластичності та ендогенної нейропротекції, що спрямовані на модуляцію внутрішньоклітинного сигналітету та регуляторних механізмів, які визначають долю клітини в умовах ішемії.

Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України у рамках тем: «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті», номер держреєстрації 0112U001939, та «Пошук та вивчення біологічно активних речовин серед природних сполук та продуктів хімічного синтезу» (номер держреєстрації 0118U001903, терміни виконання 2018-2022). Автор є відповідальним виконавцем даної теми.

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

Підвищення ефективності первинної нейропротекції при ЧМТ шляхом застосування модулятора поліамінового сайту NMDA-рецепторів проведено в кілька етапів. На першому етапі дисертант провів розробку та стандартизацію нової моделі черепно-мозкової травми різного ступеня важкості для скринінгу лікувальних властивостей різних фармакологічних засобів на щурах. Ним було запропоновано модель ЧМТ, що викликана пострілом з пневматичного пістолета в трепанаційний отвір, яка залежно від відстані пострілу, за динамікою показника летальності, рівнем маркера ушкодження головного мозку нейронспецифічної енолази та наявним неврологічним дефіцитом за шкалою stroke-index С.Р. McGraw достовірно відповідає класифікації ступеня важкості ЧМТ від важкого до легкого в залежності від відстані пострілу.

На другому етапі дослідження дисертант провів експериментальний скринінг ефективності різних доз введення 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) на моделі важкої черепно-мозкової травми (ЧМТ) і розрахував його ефективну дозу. На третьому етапі дослідження дисертант вивчав вплив Адемола на формування неврологічних порушень і когнітивного дефіциту після моделювання ЧМТ. Наступним

етапом дисертаційного дослідження було виявлення тонких молекулярно-біохімічних механізмів нейропротективної дії Адемола в умовах моделювання ЧМТ. Дисертант провів вивчення впливу Адемола на показники стероїдного стресу, окислювального і нітрозативного стресу, систему оксиду азоту, вуглеводно-енергетичний обмін, а також на концентрацію нейроспецифічних маркерів. Для більш глибокого розуміння механізму нейропротективної дії Адемола дисертант вивчав його вплив на морфо-функціональні показники нейронів кори головного мозку і нейроапоптоз.

Окремим етапом за допомогою сучасних інформаційних технологій було дослідження впливу Адемола на різні мішені нейродеструкції. Найбільш важливим етапом дослідження стала розробка та створення абсолютно нової лікарської форми – назального гелю Адемола, який дозволяє покращити нейродоступність препарату, його ефективність у гострий період ЧМТ та знизити ризики побічних реакцій. В результаті проведених досліджень дисертант отримав нові уявлення про молекулярно-біохімічні механізми дії Адемола, експериментально обґрунтував підходи до оптимізації первинної нейропротекції при ЧМТ, які полягають у назальному введенні модулятора NMDA з додатковими властивостями (антиоксидантними, енерготронними, протишемічними та антиапоптичними), а також розробив і апробував нову лікарську форму Адемола – назальний гель.

Наведені методики є загальноприйнятими в рамках поставлених завдань, в достатній мірі відображають високий рівень досліджень. Проаналізовано і зреферовано велику кількість наукової літератури та медичних джерел - 98 – кирилицею та 348 – латиницею.

У роботі використано достатню кількість лабораторних тварин для достовірного аналізу (260 щурів лінії Вістар). Переконливі результати з адекватним використанням методів статистичної обробки (кореляційний, дисперсійний, регресійний аналізи, бінарна логістична регресія) зумовили високу статистичну значущість, на основі яких дисертант обґрунтував положення, висновки та практичні рекомендації.

Все це однозначно свідчить про те, що висунуті автором наукові положення і висновки є добре обґрунтованими, достовірними, впливають з проаналізованого фактичного матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані. Практичні рекомендації прості та конкретні.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертаційна робота Семененко С.І. являє собою дослідження, в якому вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено застосування Адемола як первинного нейропротектора, а також розроблену дисертантом лікарську форму Адемола (назальний гель) при тяжкій черепно-мозковій травмі. Вперше змодельовано експериментальну модель черепно-мозкової травми різних ступенів важкості у щурів. Вперше досліджено молекулярно-біохімічні механізми нейропротекторної дії модулятора NMDA Адемола при черепно-мозковій травмі, спрямовані на переривання нейроапоптозу, покращення морфо-функціональних параметрів нейронів кори головного мозку, поліпшення вуглеводно-енергетичного обміну, нормалізацію нитроксидергичної системи та гальмування нітрозативного і оксидативного стресу. На основі вивчення результатів церебропротекторної підтримки тяжкої модельної ЧМТ доповнені наукові дані про можливість та доцільність використання адемола, як блокатора N-метил-D-аспартатних рецепторів, що володіє поліфункціональними властивостями впливу на перебіг тяжкої ЧМТ. Вперше проведений порівняльний аналіз 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) в гострий період тяжкої ЧМТ та вивчені переваги й недоліки даного фармакологічного засобу з існуючими блокаторами N-метил-D-аспартатних рецепторів, які використовуються для фармакологічної корекції у хворих з ЧМТ. Доповнено наукові дані патогенетичних механізмів впливу адемола, як первинного церебропротектора в гострий період тяжкої модельної ЧМТ. Експериментальний аналіз патогенетичних механізмів впливу 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемола) в гострий період тяжкої ЧМТ дозволив уточнити закономірності змін

центральної та церебральної гемодинаміки, зміни показників антиоксидантної рівноваги та енергетичного обміну в ГМ на фоні впливу блокатора N-метил-D-аспартатних рецепторів адемолу та визначити найбільш ефективну дозовану стратегію церебропротекторної підтримки, що здатна якнайкраще коригувати порушення при травматично пошкодженному головному мозку. Вперше експериментально доведено, що рання церебропротекторна підтримка 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемолу) при модельній тяжкій ЧМТ, сприяє зменшенню некрозу та апоптозу в ГМ, що в подальшому зменшує летальність та неврологічний дефіцит. Доповнені наукові дані, що захисні патогенетичні механізми поліфункціональної дії 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемолу) в складі терапії раннього періоду тяжкої ЧМТ базуються на усуненні: енергодефіциту, метаболічного ацидозу, зменшенні набряку та нейродеструкції мозку, корекції антиоксидантно-оксидантної системи, збереженні цитоархітектоніки ГМ, зменшенні апоптозу. Наукову новизну підтверджено 2 патентами України на корисну модель. Виготовлено назальну форму лікарського засобу, що містить адемомол. Експериментальними *in silico* та дериватографічними методами вивчено сумісність діючих та допоміжних інгредієнтів назальної лікарської форми, досліджено консистентні властивості цієї форми. Встановлено реологічні властивості досліджуваного препарату. Опрацьовано екстемпоральну технологію виготовлення назальної форми з адемомол. Проведено доклінічні дослідження інтраназальної лікарської форми, яка містить адемомол для перевірки її ефективності в лікуванні цереброваскулярної патології.

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

Змодельована нова експериментальна модель ЧМТ різних ступенів важкості у щурів дає можливість для скринінгу лікувальних властивостей різних фармакологічних засобів. В експериментальних умовах на різних за ступенем важкості моделях ЧМТ будуть вивчатися основні механізми захисного впливу лікарських засобів на травматично пошкоджений головний

мозок. Проведене наукове дослідження дозволило розробити нові експериментальні підходи до фармакотерапії тяжкої ЧМТ, що в подальшому може дозволити знизити летальність та зменшити неврологічний дефіцит у пацієнтів з тяжкою ЧМТ. Отримані результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність клінічного випробування фармакологічного засобу 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемолу) в ін'єкційній формі для лікування черепно-мозкової травми. Наявні церебропротекторні властивості адемолу в умовах травматичного пошкодження ГМ є дуже важливими, так як враховуючи можливість парентерального введення та наявність впливу на первинні патогенетичні ланки травматичного пошкодження мозку, є всі підстави для його можливого призначення хворим у ранній період травми мозку. Отримані в дисертації дані значно розширюють уявлення механізмів церебропротекторної дії нових сполук модуляторів NMDA-рецепторів та підтверджують можливість проводити цілеспрямовані кроки, для подальшого клінічного вивчення впливу 1-адамантилтилокси-3-морфоліно-2-пропанолу гідрохлориду (адемолу). Результати дослідження доповнили існуючі теоретичні знання про перебіг ЧМТ на фоні фармакокорекції новими блокаторами NMDA-рецепторів, вони чітко підтверджують та обґрунтовують подальшу можливість застосування досліджуваних фармакологічних схем в клінічній практиці. За матеріалами дисертації отримано два патенти на корисну модель 144919 Україна, МПК G 09 B 23/28 та 145038 Україна, МПК А 61 В 17/00, G 09 В 23/28, G 01 N 33/48. Результати дослідження впроваджено у навчальний та науковий процес кафедр фармакології, внутрішньої медицини №2 і біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету, кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології національного медичного університету імені О.О. Богомольця, кафедри загальної та клінічної фармації Дніпровського державного медичного університету, кафедри фармакології та клінічної фармакології Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я.

Горбачевського, лабораторії фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України.

Промислова технологія виробництва назального гелю з нейропротектором «Адемол» пройшла успішну апробацію ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ», перевірено відтворення методик технологічного регламенту та апробовано методики контролю якості. Включено до перспективного плану впровадження нових лікарських засобів на 2024-2026 роки.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за темою дисертаційної роботи опубліковано 38 праць, з них 24 статті у фахових наукових виданнях, 2 деклараційних патенти України на корисну модель, 11 тез доповідей у матеріалах з'їздів і конференцій. Всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації знайшли своє відображення у друкованих роботах. Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації, представлені в дисертації, відображені в опублікованих працях.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків

Дані досліджень, отримані у 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

Оцінюючи зміст дисертації, слід зазначити, що робота легко читається і сприймається, виклад основних результатів дослідження компактний та конкретний. Дисертація викладена на 357 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу „Матеріали та методи дослідження”, 8 розділів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літературних джерел, з них 98 – кирилицею та 348 - латиницею (займає 54 сторінки). Робота ілюстрована 65 рисунками та

32 таблицями. *Огляд літератури* докладний і структурований, автором чітко охарактеризовані невивчені на сьогоднішній день або сумнівні аспекти, що стосуються патогенезу нейродеструкції при вторинній ішемії головного мозку внаслідок черепно-мозкової травми. Показано, що ЧМТ є основною та найросповсюдженішою причиною інвалідизації і смертності осіб віком 20–40 років, коли смертність від ЧМТ у 10 разів вище, ніж від серцево-судинних захворювань, і в 20 разів вище, ніж від злоякісних новоутворень. На долю ЧМТ припадає 60% усіх випадків травм, а в структурі причин інвалідизації – 25–30%. Це зумовлює актуальність пошуку нових підходів до лікування ЧМТ, що в умовах військового конфлікту має суттєвий та визначальний вплив не лише на збереження здоров'я населення та зменшення соціально-економічного навантаження, а й на загальну обороноздатність нашої держави. Згідно сучасних уявлень, патофізіологічні механізми пошкодження мозку при ЧМТ засновані на дії первинних і вторинних факторів. Дисертантом показано в огляді, що первинні ушкодження виникають безпосередньо в момент травми. Обсяг, кількість і локалізація первинних вогнищ ураження залежать від місця прикладання травмувальної сили, її інтенсивності та тривалості впливу, відбувається ушкодження структури нейронів і гліальних клітин, виникають синаптичні розриви, порушення цілісності або тромбози судин. Особливу увагу дисертант приділив опису вторинних ушкоджень головного мозку при ЧМТ. Показано етапи формування механізмів нейродеструкції після ЧМТ – порушення кисневого режиму, енергодефіцит, трансмітерний аутокідоз, глутаматна ексайтотоксичність, порушення в системі монооксиду азоту, гіперпродукція активних форм кисню (АФК), формування оксидативного

Сучасні дані про патофізіологію мозкового інсульту й пошкодження мозку внаслідок ЧМТ свідчать про патогенетичну єдність механізмів клітинного пошкодження при будь-якій гострій церебральній недостатності, що обумовлено тканинною ішемією, яка обов'язково виникає. Ішемія у своєму розвитку має 2 стадії – біоенергетичної гіпоксії, або стадії оборотних змін, і метаболічної гіпоксії, або необоротних змін. Однотипно розвивається реакція

гліальних клітин на ушкоджуючий фактор (травму, ішемію, крововилив) з розвитком дисбалансу цитокінів, локальною запальною реакцією, що веде до пошкодження нейронів, ГЕБ і порушень мікроциркуляції. Гіперактивність системи NMDA-рецепторів, оксидативний стрес, як і продукція прозапальних цитокінів гліальними клітинами, є основними патогенетичними чинниками формування набряку мозку й індукування процесів апоптозу нейронів. Нейрозапалення – це процес, що розвивається як при травмах. При ЧМТ запалення є закономірним механізмом, особливо при відкритій ЧМТ. Дисертантом дуже докладно описано механізми формування глутамат-кальцієвого каскадного механізму ушкодження нейронів, спричинені вторинною ішемією після ЧМТ. Важливим моментом каскаду є підвищення рівня нейротрансмітерів -збуджуючих амінокислот глутамату й аспартату. Аспартат впливає тільки на N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори, які локалізовані в корі й гіпокампі. Глутамат активує три типи рецепторів: NMDA-рецептори, локалізовані в корі й таламусі, AMPA-рецептори, або рецептори до квізквалату, рецептори каїнату, що локалізовані в стріатумі гіпокампа. Активація NMDA-рецепторів сприяє входженню в клітину Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} і H_2O . Активація AMPA-рецепторів і рецепторів каїнату сприяє входженню в клітину Na^+ . Отже, зростання позаклітинної концентрації глутамату веде до загибелі клітин двома шляхами. Перший шлях - при активації глутаматом NMDA-рецепторів розвивається негайна нейротоксичність: при входженні в клітину Na^+ , Cl^- і H_2O виникає клітинний набряк, лізис мембран і клітинна смерть. Другий шлях - у період від 24 до 72 годин після ішемії формується відстрочена нейротоксичність - активація NMDA-рецепторів сприяє входу в клітину іонів Ca^{2+} , у результаті активуються фосфоліпази, протеази, вільні жирні кислоти, утворюються арахідонова кислота й вільні радикали, що веде до окиснення ліпідів і клітинної смерті. Вивчення особливостей перебігу патофізіологічних процесів цереброваскулярних розладів (і гострих, і хронічних) та травматичного пошкодження мозку показало: в основі поширення порушень цілісності клітин

і руйнування тканин при різних формах внутрішньочерепних гематом – механізми апоптозу або некрозу. Сучасна медицина має великий асортимент лікарських засобів для лікування та запобігання наслідкам ЧМТ, але не всі препарати відповідають сучасним вимогам. Тому пошук і розроблення нових високоефективних, безпечних засобів фармакологічного захисту мозку, що відрізняються політропністю фармакодинамічних ефектів, спрямованих на одночасну корекцію різних ланок патогенезу ЧМТ – один із пріоритетних напрямів розвитку фундаментальної та клінічної медицини. В огляді дисертант навів основні напрямки лікування черепно-мозкової травми в контексті доказової медицини. Показано, що ведення пацієнтів з черепно-мозковою травмою (ЧМТ) на сьогоднішній день є вкрай актуальним проблемою, як нейрохірургічної, так і реанімаційно-неврологічної практики. Протягом перших годин після тяжкої ЧМТ допомога надається бригадами швидкої медичної допомоги, а в приймальних відділеннях стаціонарів – хірургами, травматологами та анестезіологами. В спеціалізованих центрах травми та лікувальних закладах III рівня (обласні лікарні) пацієнтам із тяжкою ЧМТ надається спеціалізована медична допомога за участю нейрохірургів. Вимоги сьогодення вимагають при наданні допомоги постраждалим, незалежно від рівня медичного закладу, де вона надається, дотримання сучасних діючих рекомендацій, котрі ґрунтуються виключно на доказовій медицині, що є відображенням результатів багатоцентрових проспективних рандомізованих досліджень. Пріоритетним завданням для дослідників у цьому напрямі є пошук методів, які збільшують толерантність мозкової речовини до гіпоксичного ушкодження. Інтенсивна терапія гострих цереброваскулярних розладів включає три основні групи заходів: 1) неспецифічні, або загальні заходи для підтримки вітальних функцій; 2) специфічні заходи, спрямовані на поліпшення перфузії (внутрішньовенний або внутрішньоартеріальний тромболізис); 3) нейропротекція – превентивні заходи (антикоагулянти, антиагреганти, статини, хірургія сонних артерій). Дисертант показав в огляді, що нейропротекцію поділяють також на пряму (застосування лікарських

засобів або фізіологічних впливів, що інгібують біохімічні, метаболічні та клітинні наслідки ішемічного пошкодження) і непрямую (забезпечення відновлення кровотоку й доставки енергетичних субстратів до ішемізованої, але не загиблої тканини мозку). Дисертант навів класифікацію первинних нейропротекторів, звертаючи увагу на модулятори NMDA і AMPA. Було показано фармакологічні властивості та нейропротекторну активність кетаміну, фелбамату, рилутека, магнію сульфату та амантадину. Також продемонстрована нейропротекторна активність нових молекул з властивостями модулюючих фенциклідинові та поліамінові сайти NMDA. Вказано на перспективність пошуку серед 5-алкокси-, 5-(ді)алкіл- і 5-(о-алкоксикарбоніл-феніл) аміно-s-триазоло[с]хіназолінів та 6H-[1,2,4]-триазоло[1,5-с]хіназолін-2,5-діонів та відповідних [4,3-с] ізомерів, які неконкурентно інгібують NMDA- та/або AMPA/KA-R-рецептори. В огляді теоретично обґрунтовано доцільність доклінічної оцінки модулятора активності NMDA-рецепторів Адемолу за новим призначенням в якості церебропротекторного засобу при черепно-мозковій травмі. Приємно, що дисертант в огляді підкреслює роль вітчизняних учених-фармакологів, і зокрема представників Вінницького національного медичного університету імені М. Пирогова, таких як Г. І. Степанюк, Н. І. Волощук та А. А. Хадаковський, у створенні нейропротекторів.

У розділі «матеріали і методи дослідження» автором приведений дизайн дослідження, вказані вид лабораторних тварин (щери лінії Вістар), джерело їх отримання, умови утримання. У дисертації проведено розробку та стандартизацію нової моделі черепно-мозкової травми різного ступеня важкості для скринінгу лікувальних властивостей різних фармакологічних засобів у щурів. Модель викликана пострілом з пневматичного пістолету до трепанаційного отвору з відстані 0 см, 0,5 см та 1 см. За динамікою показника летальності, рівнем маркера ушкодження головного мозку нейронспецифічної енолази та наявного неврологічного дефіциту за шкалою stroke-index С.Р. McGraw ця модель достовірно відповідає класифікації ступеня важкості ЧМТ

від важкого до легкого в залежності від відстані пострілу, відповідно від 0 см (впритул) до 1 см. Ця модель є найбільш адекватною клінічним проявам ЧМТ і дозволяє відтворити не тільки реалізацію клітинно-молекулярно-патобіохімічного каскаду нейродеструкції, характерного для вторинної ішемії головного мозку внаслідок травми, але і прояви когнітивного дефіциту у лабораторних тварин. Використання лабораторних тварин відповідало національним і європейським біоетичним нормам.

У дисертації використовувалися сучасні біохімічні, молекулярні, електрофізіологічні, інструментальні, морфологічні та гістологічні методи дослідження для оцінки нейропротекторної дії потенційного лікарського засобу та його нової лікарської форми. Такий методичний підхід відповідає методичним рекомендаціям Державного експертного центру МОЗ України для оцінки нейропротекторної дії потенційних лікарських засобів.

Усі дослідження проводилися на сертифікованому обладнанні, а набори і окремі реактиви закуповувалися у офіційних виробників. Статистична обробка проводилася за допомогою ліцензованих комп'ютерних програм. Першим етапом дослідження була розробка та апробація власної моделі черепно-мозкової травми у щурів. Цю модель ЧМТ дисертант відтворював за допомогою потоку вуглекислого газу під тиском. Модель ЧМТ у роботі викликала пострілом пневматичного пістолету. Так, у щурів із моделлю ЧМТ, яка була викликана пострілом з пневматичного пістолету впритул до трепанаційного отвору в черепі упродовж першої доби відмічалось прогресуюче збільшення показника летальності: більше половини тварин (60%) загинуло упродовж перших 6 год від початку спостереження, що можна вважати за критичний рубіж для даної патології. В подальшому цей показник зростав, і через 20 год становив 80%. Також було встановлено підвищення в 6 разів активності нейронспецифічної енолази у сироватці крові щурів та розвиток неврологічного дефіциту у щурів (до 14 балів за шкалою С.Р. McGraw). У наступному розділі дисертант провів оцінку нейропротекторних властивостей Адемола в умовах ЧМТ. Було проведено пошук умовно-

ефективної церебропротективної дози адемола та референс-препаратів за динамікою показника летальності щурів в умовах модельної ЧМТ. Отримані дані дали змогу зробити висновок про наявність у адемола виразних церебропротекторних властивостей саме дозою 2 мг/кг в/в без розвитку побічних реакцій з боку ЦНС, які характерні для блокаторів фенциклідинового ряду NMDA-рецепторів (судоми, пригнічення когнітивно-мнестичних функцій). У наступному розділі дисертант вивчав вплив курсового введення Адемола на формування стероїдної нейротоксичності за рівнем кортизолу в умовах модельної ЧМТ. Також було досліджено вплив Адемола на показники вуглеводно-енергетичного обміну, оксидативного стресу, нитроксидергичної системи та нейровоспалення в головному мозку при ЧМТ. Аналіз отриманих даних по енергетичному обміну у щурів із тяжкою ЧМТ, які отримували розчин адемола в дозі (2 мг/кг в/в) більш ефективно, ніж застосування амантадину сульфату (5 мг/кг в/в), стримувало гіперактивацію анаеробного гліколізу, стимулювало процеси тканинного дихання, зменшувало ознаки лактат-ацидозу, розвиток вторинної альтерації клітин головного мозку недоокисненими продуктами, коригувало краще падіння активності ферментативної антиоксидантної ланки, попереджувало накопичення активних кисневих інтермедіатів та сповільнювало перебіг реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів та протеїнів в структурах головного мозку щурів ($p < 0,05$). Аналіз впливу курсового введення адемола на формування стероїдної нейротоксичності за рівнем кортизолу в умовах модельної ЧМТ показав, що застосована фармакотерапія попереджувала наростання рівня кортизолу, так у щурів, які отримували адемола рівень кортизолу в крові був меншим в 2,58 рази ($p < 0,05$), порівняно з групою контролю. При цьому, вплив амантадину сульфату на рівень кортизолу в крові був вірогідно меншим, ніж у адемола і на 49,2% ($p < 0,05$) перевищував відповідний показник у щурів з ЧМТ+адемола. Фармакотерапія досліджуваними розчинами в різній мірі зменшувала активність запальної реакції в тканинах травматично пошкодженому мозку. Так, у тварин, яким

застосовували адемола та амантадин сульфат, вміст TNF- α в тканинах мозку виявився меншим відповідно на 57,3 % та 43,5 % ($p < 0,05$). При цьому, адемола вірогідно краще, ніж амантадину сульфат та група контролю, попереджував розвиток нітрозативного стресу та збільшував запаси амінокислоти L-аргініну в клітинах головного мозку за умов ЧМТ. У наступному розділі дисертант вивчав вплив Адемола на вміст нейронспецифічної енолази, білка S100, мозкового нейротрофічного фактора та на процеси нейроапоптозу у щурів із ЧМТ. Також у цьому розділі дисертант провів оцінку морфологічних змін в структурах головного мозку щурів на тлі курсової терапії модельної ЧМТ адемолом. Аналіз отриманих даних у групі контролю (ЧМТ + 0,9% розчин NaCl) стосовно рівнів NSE та білка S 100, як маркерів пошкодження нервової тканини свідчить про те, що на 8-му добу ЧМТ у щурів групи контролю відбувається інтенсивне формування та організація ядра альтераційного осередку. При цьому, адемола та амантадину сульфат стримують розвиток інтенсивної нейрогліопроліферації за умов модельної ЧМТ, так у групах тварин, лікованих адемолом та амантадином сульфату відповідно: вміст NSE був менший на 52,1 та 29,0 %, а вміст білка S 100 був менше в 2,04 та 1,66 рази, ніж в групі контрольної патології ($p < 0,05$). Тяжка ЧМТ у щурів має депримуєчий вплив на продукцію мозкового нейротрофічного фактору. Досліджувані розчини стримують формування дефіциту нейротрофічного фактору, причому адемола значно випереджає амантадин сульфат за цим ефектом, так рівень BDNF в сироватці крові за умов лікування ЧМТ адемолом вірогідно більший на 24,1 % ($p < 0,05$), порівняно з такими показниками при лікуванні амантадином сульфатом. Аналіз спроможності знижувати рівень фрагментованої ДНК в ядрах нейронів часток кори головного мозку щурів на 8-му добу ЧМТ показує, що адемола вірогідно перевершував референс-препарат в середньому на 27,2% ($8,35 \pm 0,133\%$ проти $11,47 \pm 0,02\%$) ($p < 0,05$). У наступному розділі дисертаційної роботи було показано, що застосування адемола на 8 добу тяжкої ЧМТ показав кращий фармакологічний ефект, щодо зменшення неврологічного дефіциту та достовірну перевагу над ефектом

амантадину сульфату на 17% та магнію сульфату на 30%. Результати летальності та неврологічного дефіциту у щурів з тяжкою ЧМТ на фоні застосування референт-препаратів вказують на відсутність достовірної ефективності застосування магнію сульфату при експериментальній ЧМТ у щурів, тому для подальших експериментальних досліджень було залишено лише один препарат порівняння – амантадину сульфат. Встановлено, що адемомол препарат із високою біодоступністю, яка забезпечує можливість внутрішньовенного введення. Адемомол в достатній мірі проникає крізь гематоенцефалічний бар'єр, що є запорукою його нейропротекторної активності, а структурна подібність до β -адреноблокаторів та його афінність обумовлює лікворогіпотензивну дію похідного адамантану, що спричиняє зниження підвищеного внутрішньочерепного тиску ($p < 0,05$). Наступні розділи дисертаційного дослідження присвячені розробці та створенню нової лікарської форми Адемола – гелю для назального застосування.

Експериментальними *insilico* та дериватографічними методами вивчено сумісність діючих та допоміжних інгредієнтів назальної лікарської форми. Встановлено, що компоненти дослідної форми сумісні між собою та можуть бути поєднані в одній рецептурі. Досліджено консистентні властивості назальної форми з адемомолом. Встановлено, що реологічні властивості характеризують рідку консистенцію, тому в якості упаковки доцільно використати флакон з піпеткою (назальною насадкою), одноразову крапельницю, пропелентну або безпропелентну упаковку.

Застосований метод статистичного аналізу дав змогу правильно інтерпретувати експериментальні дані і зробити обґрунтовані висновки.

Таблиці та рисунки, які є в дисертації, логічно доповнюють її основний зміст. Достатня кількість використаних літературних джерел, глибина їх аналізу та вміле використання при написанні дисертації свідчать про хорошу орієнтованість автора в проблемах, вирішенню яких присвячена робота.

Висновки дисертації логічно випливають з результатів дослідження і повністю відповідають положенням, які були сформульовані в меті та завданні

дослідження. Фактичний матеріал добре систематизовано. Робота написана чіткою науково-літературною мовою, список літератури складається, головним чином, із сучасних наукових джерел.

Зауваження:

1. Огляд літератури дуже об'ємний, містить дублюючі фрагменти інформації.

2. Автор не використав для повноцінної оцінки стану нітроксидергічної системи головного мозку визначення експресії nNOS, eNOS, iNOS, mPHEKеNOS, mPHEKnNOS, mPHEK iNOS, концентрації стабільних метаболітів NO і нітротирозину.

3. У розділі, присвяченому вивченню енергетичного обміну при ЧМТ і впливу Адемолу, бракує даних щодо молекулярних і біохімічних показників мітохондріальної дисфункції.

4. Не вказано в якій фракції - цитозольній чи мітохондріальній гомогенату головного мозку - визначали аденілові нуклеотиди, а також лактат і піруват.

5. Як специфічний маркер ураження ЦНС бажано визначати антитіла до фенциклідинового сайту NMDA (NR2) та матриксні металопротеїнази.

6. Автором показана роль нейроаптозу при ЧМТ та антиапоптичний механізм нейропротективної дії Адемолу. Однак у роботі не вивчалася зміна специфічних молекулярних маркерів нейроаптозу - Аннексин V, білок bcl-2, Каспаза-3, прокатепсин-B, «Рецептори смерті» (DR).

7. У розділі «Матеріали і методи» відсутній підрозділ, який схематично або текстово відображав би дизайн дослідження.

8. Не обґрунтована тривалість експериментальної терапії.

9. Порядок викладення висновків не відповідає порядку викладення матеріалу дисертаційного дослідження в розділах

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. Відомо, що блокада NMDA призводить до активації каспази-1 і -11, сімейства NOD-подібних рецепторів та ініціювання нейроаптозу. Вами показано, що блокатор NMDA Адемол, навпаки, проявляє антиапоптичні властивості. Чи немає суперечностей Ваших результатів і даних інших дослідників.

2. Вами отримано переконливі дані про позитивний вплив Адемолу на показники енергетичного обміну при ЧМТ. Як блокатор NMDA може впливати на енергетичний метаболізм мозку при ЧМТ? За рахунок чого відбувається продукція АТФ, якщо цикл Кребса роз'єднаний, а анаеробний гліколіз при ЧМТ пригнічений Адемолем?

3. Є дані про аксональний транспорт деяких молекул ЛЗ при назальному їх введенні. Чи можете пояснити суть аксонального транспорту і його участь у перенесенні Адемолу?

Висновки

Дисертація Семененко Святослава Ігоревича: «Фармакологічне обґрунтування використання модулятора NMDA-рецепторів в якості церебропротектора при черепно-мозковій травмі (експериментальне дослідження)», подану на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук 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'ємом, використанням методів досліджень, новизною отриманих даних дисертація відповідає вимогам п. 7 і 9 «Порядку присудження і позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. №1179, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, а дисертант заслуговує присвоєння шуканого ступеня за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, професор **Ігор БСІЄНІЧЕВ**

ПІДТВЕРДЖУЮ
Нач. відділу кадрів Запорізького державного
медико-фармацевтичного університету
«...» ... 20... р. Підпис: *[підпис]*

[підпис]