

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Повха Вячеслава Леонідовича «Роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора (експериментальне дослідження)» що подана до захисту у спеціалізовану вчену раду К 05.600.05 при Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю медична біохімія - 14.01.32.

**1. Актуальність обраної теми.** Дисертація Повха В.Л. присвячена актуальній проблемі медичної біохімії – дослідженню молекулярних механізмів нейроретинодеструкції при ураженні зорового аналізатора різного генезу (ішемічно-реперфузійного, постконтузійного) та обґрунтуванню нових підходів до нейроретинопротекції шляхом модуляції активності NMDA-рецепторів.

Сучасна геополітична ситуація диктує потребу у фармакологічних засобах, здатних впливати на різні патобіохімічні ланки нейроретинодеструкції та акселерувати процес реабілітації при ішемічних та травматичних ураженнях тканин ока, особливо в екстремальних умовах. Слід брати до уваги неухильне зростання поширеності контузійних травм ока за останні роки та традиційно високу поширеність захворювань, які асоціюються з формуванням нейроретинопатії (наприклад, артеріальної гіпертензії та цукрового діабету). Провідною ланкою альтераційних процесів у нейронах сітківки вважається глутаматна ексайтотоксичність, асоційована з гіперактивацією NMDA-рецепторів. Не виключено, що модулятори активності NMDA-рецепторів, які володіють церебропротекторною дією, можуть впливати і на процеси нейроретинодеструкції, виявляти офтальмопротекторний потенціал. На фармацевтичному ринку України презентоване широке коло цитопротекторів нейрональної спрямованості, проте доцільність їх застосування з метою офтальмопротекції не з'ясована. Тому поглиблене вивчення нових механізмів

нейроретинопротекції залишається актуальним і дисертаційна робота Повха В.Л. беззаперечно є своєчасною. Слід підкреслити, що автором вперше експериментально обґрунтовані такі біохімічні аспекти нейроретинопротекції, які дозволяють персоніфікувати підходи до діагностики та лікування постреперфузійних та травматичних уражень сітківки в клінічних умовах.

Метою роботи Повха В.Л. було встановити роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження ока і на цій основі експериментально обґрунтувати нові підходи до корекції патології зорового аналізатора. Для реалізації поставленої мети автором було сформульовано та вирішено 5 наукових завдань, кожне з яких сформульовано чітко та логічно. Мета та завдання роботи повністю узгоджуються із темою дисертації автора.

## **2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційне дослідження є самостійним фрагментом планової НДР Науково-дослідного центру, Навчально-науково-дослідної лабораторії «Фармадар», кафедр фармакології, біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів» (номер держреєстрації 00115U007126); НДР кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті» (номер держреєстрації 0112U0021939). Дисертант є співвиконавцем вказаних тем.

## **3. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність, повнота викладення в опублікованих працях**

Спектр методичних підходів, які автор використав в роботі (біохімічні, імуноферментні, цитометричні, функціональні, фармакологічні методи

дослідження та методи математичної статистики) є цілком достатнім. Сформульовані дисертантом основні наукові положення та висновки обґрунтовані значною кількістю експериментальних досліджень.

Дослідження проведені на 272 білих нелінійних щурах-самцях та 156 кролях-самцях породи Шиншила. При роботі з лабораторними тваринами дотримані методичні рекомендації Державного фармакологічного центру МОЗ України і вимоги біоетики згідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». Дотримання етичних норм засвідчено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (протокол № 10 від 11.10.2017 р.). Отримані результати підлягали адекватній статистичній обробці, що дозволило зробити цілком обґрунтовані висновки.

Дисертаційне дослідження є самостійною науковою працею, про що свідчить особистий внесок автора в її виконання. Матеріали дисертації викладені у 16 наукових працях, в тому числі 1 стаття у зарубіжному виданні, 7 статей у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України (2 одноосібних; 5 включено до міжнародних наукометричних баз), 6 - в збірках, матеріалах з'їздів та конференцій. Отримано 2 патенти України на корисну модель.

#### **4. Наукова новизна дисертаційної роботи**

Робота характеризується беззаперечною новизною. Зокрема, автором вперше визначена роль фармакологічних модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ураження зорового аналізатора ішемічного та травматичного генезу та експериментально обґрунтована доцільність застосування з метою цитопротекції інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату та інгібітора фенциклідинового сайту мемантину, засвідчена менша ефективність блокатору іонного каналу

магнію сульфату. Встановлено, що за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора нейроретинопротекторний ефект інгібіторів NMDA-рецепторів реалізується не лише через модуляцію глутаматної ексайтотоксичності, і й через зменшення в сітківці ока мікроциркуляторних розладів, зниження рівня прозапальних та проапоптичних чинників (рівня NSE та білка S100 в крові, продуктів ліпопероксидації та карбонільних груп протеїнів в сітківці), підвищення активності глутатіонпероксидази в сітківці. Вперше засвідчено, що амантадину сульфат перевершує мемантин за здатністю коригувати рівні NSE та білка S100 в крові, показники клітинного циклу (зі зниженням рівня фрагментації ДНК) та метаболічні розлади в сітківці ока.

### **5. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження**

На основі проведених досліджень автором експериментально обґрунтована доцільність використання фармакологічних модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів (амантадину, мемантину, магнію сульфату) за новим призначенням - для диференційованої нейроретинопротективної терапії при ураженні зорового аналізатора ішемічного та травматичного генеза. Поглиблені теоретичні уявлення про роль нейронспецифічної енолази та білка S100 в механізмах реалізації глутаматної ексайтотоксичності за ураження зорового аналізатора постконтузійного та ішемічно-реперфузійного характеру. Встановлені особливості нейроретинопротективної дії модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів, що є підставою для подальшої розробки нових лікарських засобів із зазначеним видом активності.

Практичне значення роботи також підтверджується тим, що за її результатами розроблено у співавторстві 2 патенти України на корисні моделі (№ 109789; 109424). Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії та кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова МОЗ України, а також кафедр фармакологічного профілю інших вищих медичних навчальних закладів України. Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на 6 наукових форумах 2014-

2017 р.р. (Харків, 2016, Одеса, 2016; Вінниця, 2014, 2017; Запоріжжя, 2016, 2017).

## **6. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому**

Оформлення та структура дисертації відповідають чинним вимогам до кандидатських дисертацій, затверджених Наказом МОН України від 12 січня 2017 року № 40. Дисертація викладена українською мовою на 173 сторінках друкованого тексту і побудована за традиційною схемою. Представлена дисертація містить усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 2 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список цитованої літератури (223 найменування, з яких 184 латиницею). Дисертація ілюстрована 15 таблицями та 41 рисунком. Робота відповідає шифру спеціальності 14.01.32 – медична біохімія.

**Вступ** побудований за традиційною схемою і містить всі необхідні складові: актуальність теми (із висвітленням сучасного стану проблеми, акцентом на невирішених питаннях та обґрунтуванням доцільності власного дослідження), мету і завдання, об'єкт та предмет дослідження (які є вірно сформульованими та відображають етапи та шляхи вирішення нової наукової задачі), наукову новизну та практичну значимість, охарактеризовано зв'язок роботи з науковими планами, зазначено особистий внесок здобувача, форми оприлюднення результатів дослідження, кількість публікацій.

**Огляд літератури** «Біохімічні механізми та перспективні напрямки нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора (огляд літератури)» викладений на 22 стор. Розділ ілюстрований 5 рисунками.

В цій частині роботи представлені сучасні погляди на молекулярні механізми альтерації нейронів гангліозного шару сітківки за умов патології зорового аналізатору різного генезу. Розглянуті перспективні напрямки нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного пошкодження ока, а

також можливості застосування модуляторів різних сайтів NMDA-рецепторів при ретинодеструкції. Розділ надзвичайно добре ілюстрований схемами різних ланок патобіохімічного каскаду нейроретинодеструкції за умов ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатору (наприклад, рис. 1.4, 1.5). Розділ містить достатню кількість посилань на вітчизняні та зарубіжні літературні джерела, логічно та аргументовано обґрунтовує доцільність подальших досліджень.

**Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження»** викладено на 11 стор. Розділ ілюстрований 2 таблицями та 2 рисунками. В розділі наведений дизайн всіх етапів дослідження, розподіл тварин за серіями експериментів, охарактеризований матеріал дослідження, моделі ушкодження зорового аналізатора, обґрунтування вибору та схеми введення модуляторів активності NMDA-рецепторів (з урахуванням впливу на показники внутрішньоочного тиску у тварин). Детально описані біохімічні та функціональні методи дослідження, зазначена кваліфікація використаних в роботі препаратів, методи статистичної обробки отриманих результатів. Засвідчена відповідність проведеного дослідження основним біоетичним та морально-правовим нормам згідно чинних нормативних документів та законів України, підтверджених комісією з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Матеріали, моделі та методи дослідження, використані в роботі, дозволяють об'єктивно та комплексно вирішити її завдання та досягти поставленої мети.

**Розділи 3, 4, 5** присвячені власним дослідженням.

**Розділ 3 (33 стор.) «Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на показники нейроретинодеструкції за експериментального ішемічного та травматичного ушкодження зорового аналізатора»** складається з 4 підрозділів, ілюстрований 12 таблицями, 9 рисунками.

Розділ присвячений вивченню впливу модуляторів NMDA-рецепторів на рівень нейронспецифічної енолази та рівень білка S100 в сироватці крові, цитометричні маркери апоптозу та нейрогліопроліферативної активності

сітківки, мікроциркуляцію сітківки за ішемічного ураження зорового аналізатора у щурів та травматичного ураження зорового аналізатора у кролів.

За результатами розділу встановлено, що ураження зорового аналізатору ішемічного та травматичного генезу у тварин характеризується значущим підвищенням рівня маркерів нейродеструкції в крові - NSE (в 11 та 43 рази) та білка S100 (в 8 та 20 рази) упродовж 1-ої доби із персистуванням (за ішемії ока у щурів) чи посиленням (за контузії ока у кролів) ознак нейроретинодеструкції через 7 діб. За ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора введення модуляторів NMDA-рецепторів викликало дозозалежне зниження рівнів NSE (в 2-6 рази) та білка S100 (в 2-3 рази) із максимальним ефектом у амантадину сульфату. Ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатору характеризувалось підвищенням цитометричних маркерів апоптозу (клітин у фазі SUB-G0G) та нейрогліопроліферативної активності (клітин у фазі S), в той час як введення модуляторів NMDA-рецепторів зменшувало виявлені порушення із максимальним ефектом у амантадину сульфату. Інгібітори NMDA-рецепторів достовірно зменшували мікроциркуляторні порушення за умов ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатору в гострому періоді. За здатністю коригувати судинні розлади інгібітор поліамінового сайту амантадин сульфат перевершував інші модулятори NMDA-рецепторів.

**Розділ 4** (33 стор.) «Вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за експериментального ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора» складається з 3 підрозділів, ілюстрований 1 таблицею, 24 рисунками.

В розділі розглядається вплив модуляторів NMDA-рецепторів на метаболічні зміни в сітківці за ішемічного ураження ока у щурів та за травматичного ураження ока у кролів, аналізується зв'язок маркерів нейроретинодеструкції з метаболічними змінами в сітківці за ішемічного й травматичного ураження зорового аналізатора та за дії модуляторів NMDA-рецепторів.

За результатами розділу встановлено, що ішемічне та травматичне ураження зорового аналізатора у тварин характеризується зниженням рівня АТФ, підвищенням рівнів МДА, карбонільних груп протеїнів, нітратів та нітритів, глутамату, зниженням активності глутатіонпероксидази в сітківці ока. Застосування модуляторів NMDA-рецепторів зменшує метаболічні зміни в сітківці, при цьому амантадину сульфат перевершує мемантин в 1,2-1,5 рази за здатністю коригувати енергодефіцит, пригнічувати процеси ліпопероксидації та окисної модифікації білків, відновлювати активність глутатіонпероксидази, й зіставляється з мемантином за здатністю коригувати рівні глутамату та метаболітів NO в сітківці за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора. Встановлено, що за ішемічного ушкодження зорового аналізатора рівень нейронспецифічної енолази в крові найбільш сильно корелює з рівнем глутамату в сітківці, а за травматичного ушкодження ока – з показниками енергодефіциту, оксидативного та нітрозативного стресу. За дії модуляторів NMDA-рецепторів асоціації між маркерами нейроретинодеструкції та метаболічними змінами в сітківці ока ставали більш слабкими.

**Розділ 5.** «Узагальнення та обговорення результатів дослідження» представлений на 16 сторінках, узагальнює результати дослідження і зіставляє їх з даними сучасної вітчизняної та іноземної літератури.

Наведені на завершення роботи **висновки** відповідають меті та завданням дослідження, випливають із наявного матеріалу і є об'єктивними.

**Список використаних джерел** містить 223 найменування, з яких 184 латиницею. Із контент-аналізу джерельної бази рецензованої роботи випливає, що посилання на наукові роботи останніх 10 років становлять більше 75% цитованих джерел і відображають досить глибокий аналіз дисертантом сучасного наукової інформації за темою дисертації та при обговоренні її результатів. У додатках наведений бібліографічний опис друкованих робіт автора, форми оприлюднень та акти впровадження результатів дослідження.



**7. Відповідність автореферату змісту дисертації.** Автореферат відповідає за змістом матеріалу дисертації, лаконічно та інформативно відображає результати досліджень, оформлений згідно діючих вимог ДАК МОН України. Анотація до дисертації оформлена українською та англійською мовами, відповідає за змістом дисертації та автореферату.

#### **8. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення**

В цілому дисертаційна робота викладена змістовно і заслуговує позитивної оцінки. В роботі зустрічаються окремі технічні та стилістичні помилки, невдалі вислови (наприклад, деескалація, амортизація), однак суттєвих зауважень щодо змісту та оформлення даної дисертації немає.

#### **У плані дискусії хотілося б торкнутися наступних питань:**

1. Вами було відмічено, що при застосуванні блокаторів NMDA-рецепторів відмічається покращення мікроциркуляції в сітківці за умов ішемії та травми ока. Через які механізми реалізується цей ефект?

2. Які з досліджуваних в роботі біохімічних маркерів Ви вважаєте найбільш інформативними для подальшого моніторингу ефективності нейроретинопротекторної дії лікарських засобів?

Викладені зауваження та запитання не носять принципового характеру, не знижують позитивної оцінки дисертації, розроблених автором наукових положень, висновків та одержаних результатів проведених досліджень.

### **ВИСНОВОК**

Дисертаційна робота Повха Вячеслава Леонідовича на тему «Роль модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора (експериментальне дослідження)» є самостійним закінченим дослідженням, в якому обґрунтовані наукові положення, що в сукупності вирішують актуальне

завдання медичної біохімії – на основі встановлення ролі модуляторів NMDA-рецепторів в механізмах нейроретинопротекції за ішемічного та травматичного ураження зорового аналізатора обґрунтовані підходи до корекції нейроретинодеструкції за допомогою інгібітора поліамінового сайту амантадину сульфату. Дисертація відповідає вимогам п.11 «Положення про порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 року (зі змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р. та №1159 від 30.12.2015 р.), на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія.

**Офіційний опонент -**

**Завідувач науково-навчальної лабораторії**

**з біохімічних та медико-валеологічних досліджень**

**Ніжинського державного університету**

**імені Миколи Гоголя МОН України,**

**доктор медичних наук, професор**



**Л.С. Мхітарян**

*Л.С. Мхітарян*

*Л.С. Мхітарян*