НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА

«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

**КОМНАЦЬКА КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА**

УДК 615.216.8:617.7-001.3-005.4

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНІ ЕФЕКТИ МЕЛАТОНІНУ ПРИ КОНТУЗІЙНІЙ ТРАВМІ ОКА (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.03.05 ‒ фармакологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І .Пирогова, м. Вінниця

**Науковий керівник:** кандидат медичних наук, старший науковий співробітник

**Черешнюк Ігор Леонідович**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, доцент кафедри очних хвороб

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор

**Бєленічев Ігор Федорович**

Запорізький державний медичний університет,

завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури

доктор медичних наук, доцент

**Макаренко Ольга Володимирівна**

ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України", професор кафедри соціальної медицини, організації та управління охороною здоров’я

Захист відбудеться «14» листопада 2018 р. об 13-00 годині, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «12» жовтня 2018 року.



Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,

кандидат біологічних наук І.В. Данова

# ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Травми органу зору залишаються однією з основних медико-соціальних проблем більшості країн світу, і Україна в цьому аспекті не є винятком: у нозологічній структурі первинної інвалідності вони займають третє місце (Іпатов А. В. та співавт., 2016), у рейтингу специфікації очного травматизму, у т.ч. і дитячого, за важкістю тупі травми (контузії) займають друге місце після проникаючих поранень ока (Рыков С. А. и соавт., 2012; Bućan K. et al., 2017; Lee R., Fredrick D., 2015; Quezada-Del Cid N. C. et al., 2015). Слід підкреслити, що в теперішній час серед населення, що не перебуває в зоні активних воєнних дій, частота пошкоджень очного яблука, в тому числі й контузійного характеру, не має тенденції до скорочення, а серед побутових і кримінальних травм вона продовжує лідирувати (Іпатов А. В. та співавт., 2016; Нероев В. В. и соавт., 2010; Риков С. О., 2011). Особливої значимості очний травматизм набуває під час проведення бойових дій, що, на превеликий жаль, ще більше підвищує актуальність цієї проблеми в Україні.

При контузії ока, після короткочасного механічного впливу на очне яблуко, послідовно розвивається цілий каскад складних патофізіологічних механізмів, внаслідок яких відбувається ураження різних структур ока, їх клітин, особливо сітківки та зорового нерву (ЗН), що призводить, залежно від ступеня тяжкості травми, до порушення зорових функцій: від незначних транзиторних функціональних розладів до стійкого зниження гостроти зору, а в низці випадків - сліпоти (Аветисов С. Э. и соавт., 2008; Blanch R. J. et al., 2013; Naskar A. K. et al., 2018; Weichel E. D., Colyer M. H., 2008). Згідно сучасних уявлень, при контузії ока механізм пошкодження та загибелі клітин пов'язаний з розвитком енергетичного дефіциту, порушенням іонного балансу, надмірному вивільненню глутамату та аспартату, внутрішньоклітинному накопиченню кальцію, підвищенням активності внутрішньоклітинних ферментів, надлишковому синтезу NO, інтенсифікацією вільно-радикального окислення, звільненням і активацією арахідонової кислоти, утворенням простагландинів і лейкотрієнів, індукцією апоптозу (Зеленцов С. Н., 2014; Blanch R. J. et al., 2014; Bricker-Anthony C. et al., 2014; Povh V. L. et al., 2018; Wang H. C. et al., 2014). Слід відмітити, що при контузійному ураженні ока середнього та важкого ступеня спостерігається офтальмогіпертензія, яка згодом переходить у гіпотонію, яка призводить також і до ішемії-реперфузії сітківки та ЗН, що значно підвищує ступінь ушкодження вказаних структур (Підвальна У. Є., 2013; Чудин А. В., 2016).

Не зважаючи на численні експериментальні та клінічні дослідження, сучасне лікування контузійних уражень ока є недостатньо ефективним і розробка нових стратегій у комплексній терапії хворих із вказаним видом травми залишається актуальною проблемою (Алексеева И. Б. и соавт., 2009; Баринов Э. Ф., 2013; Красновид Т. А., 2011; Недзвецкая О. В., 2015; Слувко Е. Л., 2015). Теоретично, на сьогоднішній день існує достатньо потенційних можливостей терапевтичного впливу на основні ланки патогенезу травматичних та ішемічних ушкоджень сітківки та ЗН. Поява в клінічній практиці великої кількості нових метаболітотропних лікарських засобів із цитопротекторною активністю (цитиколін, корвітин, тіотриазолін та ін.), на нашу думку, могла б сприяти покращенню результатів терапії контузійних уражень ока. Однак, відсутність відповідних доклінічних і клінічних досліджень не дає можливості використання їх при травмах органу зору на засадах доказової медицини.

При створенні чи пошуку ефективного нейропротекторного засобу необхідно зважати на наявність у нього ключових видів фармакологічної активності, поєднання яких обґрунтовує перспективність його застосування при контузійних травмах ока, а саме: антиоксидантну, антиексайтотоксичну, енергомодулювальну та антигіпоксичну дії, ендотеліопротективну спрямованість, антиапоптотичну та антипроліферативну спрямованість, адаптогенний та актопротекторний ефекти. Саме таке поєднання вищезазначених фармакодинамічних властивостей, згідно літературних даних, притаманне мелатоніну (Беспятых А. Ю. и соавт., 2009; Захаров А. В. и соавт., 2017; Рапопорт С. И., 2014; Соловйова Н. В., 2015; Чумак З. В. и соавт., 2017), що обґрунтовує доцільність проведення експериментальних досліджень із вивчення його ефективності в терапії захворювань зорового аналізатора травматичного ґенезу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом спільної науково-дослідної роботи Науково-дослідного центру, Навчально-науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки лікарських засобів та біологічно-активних речовин «Фармадар» та кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України на тему: «Доклінічна оцінка перспективних органопротекторів» (№ державної реєстрації 00115U007126) і виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дисертант є співвиконавцем вказаної тематики НДР.

**Мета та завдання дослідження:** Мета - на підставі експериментальних досліджень обґрунтувати доцільність застосування мелатоніну в якості засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень у зоровому аналізаторі за умов його травматичного ураження.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання**:

1. Створити та експериментально обґрунтувати вибір моделі контузійної травми ока для оцінки ефективності нейропротекції.

2. Експериментальним шляхом обґрунтувати умовно-терапевтичну дозу мелатоніну при моделюванні контузійного ураження органу зору.

3. Вивчити вплив мелатоніну на показники апоптозу та проліферації в різних структурах зорового аналізатора (ендотелій рогівки, епітелій кришталика, сітківка) за умов експериментальної контузії ока.

4. Оцінити дію мелатоніну на показники оксидативного й нітрозативного стресу та енергетичного обміну в зоровому аналізаторі при експериментальному контузійному ураженні органу зору.

5. Провести вивчення впливу мелатоніну на мікроциркуляцію в судинах циліарного тіла та внутрішньоочний тиск кролів без офтальмопатології та при контузійному ураженні органу зору.

6. Провести порівняльну оцінку ефективності застосування мелатоніну та референс-препаратів (цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну) з метою ліквідації структурно-функціональних порушень при експериментальній контузії органу зору.

*Об’єкт дослідження:* структурно-функціональні зміни у зоровому аналізаторі з його експериментальним контузійним ураженням.

*Предмет дослідження:* нейропротекторні властивості мелатоніну при контузійній травмі органу зору.

*Методи дослідження:* фармакологічні,біохімічні, імуноферментні, цитологічні, функціональні, гістологічні, електрофізіологічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі вперше, з використанням комплексного підходу, здійснено доклінічну оцінку ефективності мелатоніну в якості засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень в органі зору за умов його контузії на власно створеній моделі травматичного ураження зорового аналізатора у кролів.

Вперше на моделі контузії ока показано, що семиденне курсове введення мелатоніну, дозою 10 мг/кг двічі на добу внутрішньовенно, сприяло прояву антинейрогліопроліферативної дії та антиапоптотичної дії препарату в клітинах сітківки, рогівки та кришталика. Вперше досліджені та узагальнені функціональні (позаклітинні) ефекти мелатоніну на орган зору при його контузійній травмі. Так, вперше показано, що семиденне курсове введення мелатоніну в дозах 5, 10 та 15 мг/кг не впливає на середні значення внутрішньоочного тиску у кролів без офтальмопатології, а за умов постконтузійної гіпотонії – підвищує знижений внутрішньоочний тиск, і за цією стабілізуючою дією мелатонін у дозі 10 мг/кг перевершив мелатонін дозами 5 та 15 мг/кг та референси. Вперше досліджено кровоплин в судинах циліарного тіла ока в динаміці його контузійної травми та встановлено, що семиденне курсове введення мелатоніну сприяло відновленню циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні.

Вперше встановлено, що механізми нейропротекторної дії мелатоніну при контузії органу зору реалізуються за рахунок зменшення в крові активності нейрон-специфічної енолази та рівня білку S 100, зменшення маркеру апоптозу в сітківці, ендотелію рогівки та епітелію кришталика, зменшення маркеру нейрогліальної проліферації, зниження в сітківці рівня карбонільних груп протеїнів, малонового діальдегіду, нітритів та нітратів, глутамату та підвищення рівня АТФ і глутатіонпероксидази, підвищення зниженого показника внутрішньоочного тиску та відновлення циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні. Доповнено наукові дані про механізми дії мелатоніну, які ґрунтуються на перериванні АФК-залежних механізмів вазоконстрикції та нейродеструкції.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено спосіб підвищення ефективності лікування контузійної травми органу зору шляхом застосування за новими призначенням метаболітотропних цито-(органо-) протекторів (мелатоніну, цитиколіну, корвітину, тіотриазоліну). Результати експериментально обґрунтовують доцільність застосування мелатоніну в терапії контузії зорового аналізатора, створення його нової лікарської форми, з метою впровадження препарату в практичну систему охорони здоров’я за новим призначенням, а саме як нейропротектора при контузійній травмі органу зору, та внесення змін по розширенню показів до його застосування в офтальмологічній практиці.

На даний час, на основі отриманих експериментальних даних нейроретинопротекторної активності мелатоніну в умовах контузійної травми органу зору, здійснюється розробка та створення лікарського засобу з нейропротекторними властивостями ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» (наказ по ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця» від 14.12.2017 р. № 1217/14-01).

Розроблена модель контузії ока може бути використана в доклінічній оцінці потенційних лікарських засобів та біологічно-активних сполук з нейроретинопротекторною активністю (патент України на корисну модель №109424 від 25.08.2016 та №109789 від 12.09.2016). Результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є особистою науковою працею автора. Роботу виконано на базі Науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дисертант самостійно провів патентно-інформаційний пошук, проаналізував наукові літературні джерела за темою дисертації. Разом із науковим керівником визначив мету та завдання, розробив та апробував нову модель контузії ока у кролів, а також створив класифікацію ступенів тяжкості травми та окреслив коло критеріїв і маркерів по визначенню цього стану. Опанував методики біохімічних, функціональних та цитологічних досліджень, самостійно виконав експериментальну частину роботи, виконав математичну обробку отриманих результатів, провів їх аналіз та узагальнення та сформулював висновки.

Гістоструктуру мікропрепаратів вивчено за консультативної допомоги к. мед. н., доц. кафедри гістології ВНМУ ім. М.І. Пирогова А. П. Короля. Дослідження показників мікроциркуляції в оці виконано на базі Навчально-науково-дослідної лабораторії з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук «Фармадар» при допомозі д. мед. н., проф. О. А. Ходаківського. Окремі фрагменти біохімічних досліджень виконано за допомоги к. мед. н., доц. кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова А. В. Мельника. У роботах, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних експериментальних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовка статей до друку. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження.

**Апробація результатів дисертації**. Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня, а саме на: XIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку» (Вінниця, 2016); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Філатовські читання» (Одеса, 2016); VІІІ Національному з’їзді фармацевтів України «Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи» (Харків, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); V Національному з’їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); ІХ Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України» (Вінниця, 2017).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, які повністю відображають зміст роботи і отримані результати, з них: 6 статей опубліковано в рекомендованих ДАК МОН України наукових фахових виданнях (з яких 3 входять до переліку міжнародних наукометричних баз), 2 патенти України на корисну модель, 6 робіт опубліковано в матеріалах і тезах науково-практичних конференцій та конгресів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 186 сторінках друкованого тексту, складається з: анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 3 розділів власних досліджень, розділу узагальнення та обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 31 рисунками і 14 таблицями. Список використаних джерел містить 248 літературних джерел, з них 94 кирилицею і 154 латиницею.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи.** Досліди виконані на 80 кролях самцях породи Шиншила масою 3,5-4,0 кг, які утримувались в стандартних умовах віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Роботи з експериментальними тваринами проведені з дотриманням Закону України №3447-15 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006) та згідно вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Дотримання морально-етичних норм при дослідженні засвідчила комісія з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (висновок № 1 від 31.01.2018 р.). Модельну контузію ока (МКО) у кролів відтворювали за власно створеною методикою із використанням газобалонного пневматичного пістолету марки «Байкал МР-654К» (РФ, Іжевськ, № сертифікату РОСС RU МЖ03.В02518) в умовах внутрішньовенного (в/в) пропофолового (40 мг/кг, «Fresenius Kabi», Австрія) наркозу. Дослідження проводились на МКО важкого ступеню.

Скринінгове дослідження мелатоніну у дозах 5, 10 та 15 мг/кг в умовах МКО, дозволило встановити його умовно-терапевтичну дозу для подальшої поглибленої оцінки величини нейропротекторної активності - 10 мг/кг. Далі в експериментах досліджували мелатонін (Melatonin, Sigma Chemical Co., St. Louis, США) у дозі 10 мг/кг і препарати порівняння: цитиколін («Сомазина», Ferrer International, S.A., Іспанія) - 250 мг/кг, тіотриазолін («Тіотриазолін», ПАТ «Галичфарм», Україна) - 100 мг/кг, корвітин («Корвітин», ЗАТ НВЦ "Борщагівський ХФЗ", Україна) - 10 мг/кг. Розчин мелатоніну готували *ex tempore* із субстанції - спочатку розчиняли в етанолі і в подальшому доводили 0,9% розчином NaCl (фінальна концентрація етанолу - 5%, мелатоніну - 2,5 мг/мл) (Manev H. et al., 1997). Групі контрольної патології (КП) (тварини з контузією ока без цитопротекторної терапії) вводили 0,9% розчин NаСІ в еквівалентній кількості. Розчини досліджуваних речовин вводили в/в повільно у попередньо катетеризовану (внутрішньовенний катетер, ERG 22 G, Польща) крайову вену вуха кроля. Мелатонін, як і референс-препарати, вводили двічі на добу, з інтервалом у 12 год, упродовж 7-ми діб. Перше застосування - через годину після моделювання патології. Останнє введення - за 12 год до виведення піддослідних тварин з експерименту шляхом евтаназії та забору біоматеріалу на дослідження.

Активність нейрон-специфічної енолази (NSE) та титр білка S 100 (S100) визначали в сироватці крові методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням наборів NSE ELISA KIT (DAI, США) та S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) на приладі фірми “Hipson” (Чехія). Інтенсифікацію проліферативних явищ та апоптозу у структурах ока (сітківка, ендотелій рогівки та епітелій кришталика) досліджували використовуючи протоковий ДНК-цитометричний аналіз на багатофункціональному науково-дослідному однойменному цитометрі “Partec PAS” (Partec, Німеччина) (Черешнюк І. Л., 2015). Суспензії ядер клітин отримували за допомогою наборів для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA (Partec, Німеччина), до складу яких входить діамідинофеніліндол (DAPI). З використанням програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) проводили аналіз фрагментації ДНК (апоптоз) шляхом виділенням ділянки SUB-G0G1, нейрогліальну проліферацію оцінювали за відсотковим співвідношенням клітин у фазі синтезу ДНК (фаза S) до їх загальної кількості у суспензії (Войткова В. В., 2010; Шмаров Д. А. и соавт., 2013).

Зміни метаболічних показників у сітківці ока кролів оцінювали через 7-м діб після моделювання контузії. Вміст АТФ визначали в безбілковому трихлороцтовому екстракті сітківки ока 1:5 (10% розчин трихлороцтової кислоти) хроматографічним методом (Прохорова М. И., 1982; Чекман І. С., 2016). Ступінь активації оксидативного стресу в сітківці оцінювали за кінцевим продуктом процесу перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тесті з тіобарбітуровою кислотою - малоновим діальдегідом (МДА) (Владимиров Ю. В., Арчаков А. И., 1972; Чекман І. С., 2016) та показником окисної модифікації білка (ОМБ) за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразином - карбонільними групами протеїнів (КГП) (Заічко Н. В., 2003; Чекман І. С., 2016). Стан системи ретинального антиоксидантного захисту оцінювали за активністю глутатіонпероксидази (ГПО) спектрофотометричним методом за інтенсивністю забарвленого комплексу відновленого глутатіону (Власова С. Н. и соавт., 1990; Чекман І. С., 2016). Вміст стабільних метаболітів оксид азоту - нітритів та нітратів, визначали за реакцією з реактивом Грісса (Коренман И. М., 1975; Чекман І. С., 2010). Вміст глутамату досліджували методом тонкошарової хроматографії (Чекман І. С., 2016). Для проведення морфологічних досліджень видаляли внутрішньоочну частину ЗН, яку поміщали у 10% нейтральний формалін та після стандартної гістологічної проводки заливали у парафін. На ротаційному мікротомі виготовляли повздовжні та поперечні зрізи товщиною 5 мікрон, які депарафінували за стандартною методикою та забарвлювали гематоксилін-еозином (Коржевский Д. Э., 2007; Kaskel D. et al., 1976).

Функціональні методи дослідження ґрунтувались на оцінці змін внутрішньоочного тиску (ВОТ) та параметрів мікроциркуляції на тлі застосування досліджуваних препаратів в умовах МКО та без офтальмопатології. ВОТ вимірювали тонометром Icare (Фінляндія) в динаміці на 1, 4 та 7 добу експерименту. В кожній серії, перед початком першого застосування препаратів, обов’язково реєстрували значення (фоновий рівень) ВОТ. Дію мелатоніну та референсів на гемодинаміку в циліарному тілі при МКО у кролів вивчали за допомогою лазерного доплерівського флоуметричного модуля Biopac (США). Датчик прикладали до очного яблука в місці проекції циліарного тіла, яке є вільно доступним для зовнішнього огляду (Киселева Т. Н. и соавт., 2014). Послідовно визначали фонові значення показника мікроциркуляції (в ум. од.), його зміни в умовах МКО, відповідно, через 24 год (1-ша доба), на 4-ту та 7-му добу експерименту. Показники реєстрували через 2 год після введення препаратів.

Результати дослідження обробляли за допомогою статистичної програми StatPlus 2009. Використовували параметричний t-критерій Стьюдента в разі нормального розподілу варіаційного ряду, непараметричний критерій W Уайта ‒ за його відсутності, парний критерій Ť Вілкоксона – для визначення значущих змін у динаміці всередині групи, кутове перетворення Фішера – при обліку результатів в альтернативній формі. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності р<0,05 (95%).

**Результати досліджень та їх обговорення.** *Характеристика моделі контузійної травми зорового аналізатора.* Контузійну травму зорового аналізатора у кролів моделювали за власно розробленою та апробованою методикою. В якості уражуючого елементу задіяно силу потоку вуглекислого газу під тиском при холостому пострілі із пневматичного пістолету. Розроблені критерії оцінки величини та характеристики ступенів контузії в залежності від відстані пострілу за змінами активності і рівня в сироватці крові нейромаркерів цитодеструкції, а саме NSE та S100. За допомогою отриманих результатів активності нейромаркерів, при збільшенні відстані пострілу від 0 см до 1,0 см до центру рогівки ока кролів, було запропоновано класифікацію важкості контузії: важкого, середнього та легкого ступеня. Експериментальні дослідження проводились на МКО важкого ступеню, що відтворювалась при умовах коли отвір затворної рами пістолету був приставлений до центру рогівки впритул. Через 24 год після моделювання патології, активність маркера мембранної цілісності нейронів NSE вірогідно (р<0,05) підвищилась, відносно початкових значень (0,35±0,02 нг/мл), у середньому в 43,3 рази, що вказало на розвиток суттєвої деструкції нейронів та превалювання некротичного типу їх загибелі. На 7-му добу МКО важкого ступеню рівень іншого маркеру, білку S 100, який відображає активність астроцитарної глії як закономірну відповідь на масивне руйнування нейронів, зріс, відносно початкових значень (0,57±0,03 нг/мл), у середньому в 39,7 рази, що засвідчило значне первинне ураження масиву нейронів та інтенсифікацію нейрогліопроліферативних процесів. Отримані дані вказують на адекватність даної моделі для відтворення контузійної травми зорового аналізатора, яка супроводжується вірогідними деструктивними змінами в нейронних структурах органу зору.

*Скринінг нейропротекторної активності мелатоніну на моделі контузійної травми ока.* Скринінгове вивчення розпочали з дозозалежної порівняльної оцінки наявності та величини нейропротективної дії у мелатоніну за активністю NSE та ВОТ. Дослідження впливу мелатоніну на ВОТ, в умовах постконтузійної гіпотонії ока, показало, що його застосування дозами 5 і 15 мг/кг, які за своїм коригуючим ефектом не мали між собою достовірних відмінностей, проявив вірогідно менший стабілізуючий вплив за дозу 10 мг/кг. Семиденне терапевтичне введення в організм кролів без офтальмопатології мелатоніну дозами 5, 10 та 15 мг/кг не мало вірогідного впливу на коливання ВОТ. Терапевтичне застосування мелатоніну у скринінгових дозах сприяло послабленню явищ нейродеструкції, що характеризувалось достеменним, відносно групи КП, зниженням активності NSE у 1,7 разів, і цей вплив був більш вираженим, ніж при застосуванні мелатоніну дозами 5 та 15 мг/кг. Проведене дослідження мелатоніну в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг та 15 мг/кг, в умовах МКО, дозволило встановити його умовно-терапевтичну дозу - 10 мг/кг для подальшої поглибленої оцінки величини нейропротекторного ефекту.

Наступний крок - порівняльна оцінка цього ефекту із найбільш відомими та широко застосовуваними протекторами, такими як цитиколін, тіотриазолін та корвітин. Встановлено, що мембранопротекторна активність мелатоніну (10 мг/кг) за зменшенням активності маркеру нейроцитодеструкції NSE в кінці першої доби МКО, вірогідно перевершила аналогічний ефект цитиколіну на 9%, корвітину на 20,2% та тіотриазоліну на 23,9% (р<0,05) (рис. 1). Нейроретинопротекторна дія мелатоніну є важливою, провідною складовою у такому більш об’ємному понятті як нейропротекторна дія препарату на зоровий аналізатор в цілому.

Рис. 1. Вплив мелатоніну, цитиколіну, корвітину та тіотриазолінуна активність в крові через 24 год NSE та на 7-му добу експерименту рівня S100.

Примітки:\* - р<0,05 відносно інтакту; # - р<0,05 відносно контрольної патології; € - р<0,05 відносно тіотриазоліну; ©- р<0,05 відносно корвітину; ° - р<0,05 відносно цитиколіну.

Дослідження змін титрів S100, обраного нами в якості нейромаркеру, вказує на активацію нейроглії, що є закономірною, більш відстроченою ніж NSE, відповіддю нервової тканини на деструкцію мембран нейронів та запальну реакцію в них (Пискунов А. К., 2010; Thelin E. P. et al., 2016). Наприкінці терапії МКО, всі досліджувані препарати сприяли вірогідному зменшенню рівня S100 відносно КП, найбільшу дію щодо стабілізації поділу нейроглії проявили мелатонін та цитиколін, і меншою мірою корвітин та тіотриазолін (рис. 1). При цьому, за своїм ефектом мелатонін достеменно переважав цитиколін на 20,7%, корвітин на 31,5% та тіотриазолін на 39,3% (р<0,05). Це вказує на наявність у них антинейрогліопроліферативної активності та опосередковано свідчить про первинний мембранопротекторний вплив, оскільки обидва ефекти взаємопов’язані між собою.

*Дослідження впливу мелатоніну та референс-препаратів на показники апоптозу та проліферації в різних структурах зорового аналізатора за умов МКО.* Для цитопротекції загалом, та для нейропротекції зокрема, важливо щоб препарат одночасно обмежував як апоптоз, так і некробіоз (Супрун Э. В., Громов Л. А., 2011). Досліджені на скринінговому етапі нейромаркери NSE та S100 характеризують інтенсифікацію виключно некротичних змін, оскільки їх експресія неможлива при збереженні цілісності клітинної мембрани (Гришанова Т. Г. и соавт., 2011; Haque A. et al., 2018). Саме цитологічна цілісність у морфо-генетичному плані маркує апоптоз (Kroemer G. et al., 2009). Використовуючи протоковий цитометричний аналіз, ми оцінили вплив мелатоніну на перебіг апоптотичних процесів в клітинах сітківки, ендотелію рогівки та епітелію кришталика.

Нами встановлено, що на 7-му добу МКО в клітинах сітківки, рогівки та кришталика кролів верифікувався високий рівень апоптозу, що підтверджувалось підвищенням відсотку клітин з ознаками фрагментації ядерної ДНК, які були обмежені періодом SUB-G0G1 клітинного циклу на гістограмі (табл. 1-2). Курсове застосування мелатоніну та тіотриазоліну сприяло зменшенню проявів апоптозу в клітинах заднього епітелію рогівки (знизився рівень апоптотичного маркера на 20,5% та 11,6% (р<0,05) проти КП) та клітинах епітелію кришталика (знизився рівень апоптотичного маркера на 72,4% та 13,3% (р<0,05) проти КП) (табл. 1). Антиапоптотична активність мелатоніну на клітини заднього епітелію рогівки та епітелію кришталика є одним із механізмів його цитопротекторної дії.

*Таблиця 1*

**Вплив мелатоніну та тіотриазоліну на фрагментацію ядерної ДНК клітин ендотелію рогівки та епітелію кришталика на сьому добу експерименту**

|  |  |
| --- | --- |
| Дослідні групи | SUB-G0G1 (фрагментація ДНК), у % |
| Ендотелій рогівки | Епітелій кришталика |
| Інтактні кролі (n=8) | 0,98±0,09 | 0,67±0,06 |
| Контрольна патологія (n=8) | 4,14±0,05 \* | 7,36±0,12 \* |
| МКО + мелатонін, 10 мг/кг (n=8) | 3,29±0,07 \*#€  | 2,03±0,09 \*#€ |
| МКО + тіотриазолін, 100 мг/кг (n=8) | 3,66±0,07 \*#  | 6,38±0,17 \*# |

Примітки: \* – р<0,05 відносно інтактних тварин; # – р<0,05 відносно контрольної патології; € – р<0,05 відносно тіотриазоліну.

Відносно групи КП, показник ідентифікації апоптозу в клітинах сітківки на тлі терапії мелатоніном та цитиколіном був вірогідно меншим на 52,1% та 25,8% відповідно (р<0,05) (табл. 2). Отже, мелатонін зменшив як некротичні так і апоптотичні процеси в сітківці, що є одним із механізмів його нейропротекції в умовах МКО. Отримані дані свідчили про наявність у мелатоніну антиапоптотичної дії в умовах МКО, яка за своєю величиною переважала дію цитиколіну та тіотриазоліну.

Активація проліферативних процесів - закономірна патоморфофункціональна відповідь тканини на альтерацію внаслідок некротичних або апоптотичних процесів (Войткова В. В., 2010). Наростання проліферативної активності в нейронних структурах зорового аналізатора асоційовано, виключно, із поділом нейроглії (Kaur C. et al., 2006). Так, на 7-му добу МКО відмічено підвищення проліферативної активності серед ретинальних клітин за рахунок нейрогліального компоненту, який ідентифікували за підвищенням відсоткового співвідношення клітин у фазі S клітинного циклу до їх загальної кількості у суспензії у 4,4 рази (табл. 2). На тлі терапії МКО мелатоніном, відсоток ядер в суспензії клітин сітківки, що перебували у фазі S, був вірогідно менший, відносно цього ж показника у групі КП, в середньому на 54,7%, при цьому мелатонін переважав цитиколін в середньому на 44,3% (р<0,05).

*Таблиця 2*

**Вплив мелатоніну та цитиколіну на фрагментацію ядерної ДНК та нейрогліальну проліферацію у клітинах сітківки кролів на сьому добу контузійної травми ока**

|  |  |
| --- | --- |
| Дослідні групи | Фази клітинного циклу, у % |
| SUB-G0G1 (апоптоз) | S (нейрогліальна проліферація) |
| Інтактні кролі (n=8) | 0,95±0,09 | 0,17±0,03 |
| Контрольна патологія (n=5) | 13,93±0,56 \* | 0,75±0,08 \* |
| МКО + мелатонін, 10 мг/кг (n=5) | 6,67±0,63 \*#° | 0,34±0,04 \*#° |
| МКО + цитиколін, 250 мг/кг (n=5) | 10,33±0,86 \*# | 0,61±0,09 \*# |

Примітки: \* - р<0,05 відносно інтактних тварин; # - р<0,05 відносно контрольної патології; °- р<0,05 відносно цитиколіну.

Нейроретинопротекторна дія мелатоніну також була підтверджена гістологічним дослідженням. При порівняльному, за допомогою світлової мікроскопії, аналізі гістопрепаратів ЗН, у групі КП на 7-му добу МКО візуально помічені явища деструкції та нейродегенеративних змін. При курсовому введенні мелатоніну або цитиколіну, візуально явища деструкції та дегенерації у волокнах nervus opticus були незначними порівняно із КП. Порівняльна мікроскопія гістопрепаратів ЗН являє собою візуальне та якісне підтвердження тим кількісним числовим даним, які ми отримали при проведенні протоково-цитометричного аналізу клітин у фазі S та імуноферментного визначення змін сироваткових титрів S100. Слід зауважити, що коли мова йде про блокування розмноження клітин нейроглії, мається на увазі вторинна органопротекція, оскільки саме цей тип клітин спроможний підтримувати асептичне запалення у вогнищі деструкції, експресуючи інтерлейкіни, цитокіни та лейкотрієни (Cho H. J. et al., 2013).

*Дослідження впливу мелатоніну та референс-препаратів на перебіг метаболічних процесів в сітківці у постконтузійний період*. Встановлено, що наприкінці 7-ої доби МКО у сітківці кролів КП мали місце виразні зміни у метаболічному гомеостазі, а саме: на тлі ескалації явищ оксидативного стресу, набував розвитку енергодефіцит, відбувався дисбаланс у функціонуванні системи NO. Курсова семиденна терапія МКО мелатоніном вірогідно ліпше за корвітин та цитиколін сприяла зниженню рівня глутамату на 24,4% та 21,9% при паралельному зростанні пулу АТФ на 51% та 15,7%, сприяла послабленню процесів оксидативного стресу, на що вказувало вірогідне зменшення рівнів маркерів МДА на 30,1% та 15,7%, КГП на 31,2% та 11,6% на тлі достовірного зростання активності ГПО на 24,4% та 10,4% та зменшенні вмісту стабільних метаболітів NO на 40,3% та 24,8% (р<0,05). Отже, за спроможністю нормалізувати внутрішньоретинальний метаболізм мелатонін перевершив корвітин та цитиколін (рис. 2).

Рис. 2. Вплив мелатоніну, корвітину та цитиколіну на рівень глутамату, АТФ, стабільних метаболітів NO та прояви оксидативного стресу в сітківці кролів при модельній контузії ока на сьому добу експерименту.

Примітки: \* - р<0,05 відносно інтакту; # - р<0,05 відносно контрольної патології; ° - р<0,05 відносно корвітину; & - р<0,05 відносно цитиколіну.

Ефект мелатоніну вплив на вміст нітритів та нітратів - може бути підґрунтям до обмеження нітрозативного стресу, як одного із проявів загального оксидативного стресу, розвиток якого лімітується утворюваним із NO пероксинітритом. Ця дія має опосередкований характер через його модулювальний вплив на формування глутаматної ексайтотоксичності, енергодефіциту та прямої антиоксидантної активності, яка дозволяє блокувати синтез пероксинітриту та вберігати тільки що утворений NO від атак вільними радикалами (Chan T. Y., Tang P. L., 1996; Cuzzocrea S. et al., 1997; Lau A., Tymianski M., 2010; Marshall K. A. et al., 1996). Антиоксидантний механізм нейропротективної дії мелатоніну вочевидь є одним з найважливіших, тому що оксидативний стрес відіграє роль першого плану в нейродеструкції, викликаній контузійним ураженням ока.

Таким чином, провідні складові механізму нейропротекторної дії мелатоніну при МКО характеризуються зниженням інтенсивності ПОЛ і ОМБ та активацією антиоксидантного захисту сітківки, покращенням енергетичного метаболізму сітківки, модулювальним впливом на обмін NO.

*Дослідження впливу мелатоніну та референс-препаратів на показники ВОТ та мікроциркуляцію у судинах циліарного тіла.* МКО у кролів супроводжувалась стабільним зниженням ВОТ зі слабкою, статистично недостовірною, динамікою до подальшого зниження упродовж наступних 7-ми діб. Проведене дослідження показало, що в умовах МКО, всі досліджувані препарати проявили спроможність підвищувати знижений ВОТ, проте сила такого ефекту у них достовірно відрізнялась (табл. 3). Серед препаратів порівняння, за спроможністю коригувати зниження ВОТ за умов МКО, відносно КП, найбільш ефективним у всі добові періоди спостереження виявився корвітин, терапія яким сприяла вірогідному зростанню ВОТ відносно цитиколіну та тіотриазоліну відповідно на 42,9% та 66,7%, поступаючись при цьому мелатоніну на 11,7% (р<0,05).

*Таблиця 3*

**Динаміка внутрішньоочного тиску у кролів на тлі семиденного курсового застосування мелатоніну, цитиколіну, корвітину або тіотриазоліну за умов контузії ока (М±m, n=10)**

|  |  |
| --- | --- |
| Дослідні групи | ВОТ, у мм.рт.ст.  |
| Фон | 1 доба | 4 доба | 7 доба |
| Контрольна патологія | 7,4±0,2 | 2,9±0,2 \* | 2,8±0,1 \* | 2,7±0,2 \* |
| МКО + мелатонін, 10 мг/кг | 7,3±0,3 | 5,0±0,2 \*#€&° | 6,1±0,2 \*#€&° | 6,7±0,2 \*#€&° |
| МКО + цитиколін, 250 мг/кг | 7,2±0,3 | 3,9±0,2 \*#€ | 4,1±0,2 \*#€ | 4,2±0,3 \*#€ |
| МКО + корвітин, 10 мг/кг | 7,3±0,2 | 4,5±0,1 \*#€& | 5,0±0,2 \*#€& | 6,0±0,17 \*#€& |
| МКО + тіотриазолін, 100 мг/кг | 7,1±0,2 | 3,5±0,1 \*# | 3,5±0,2 \*# | 3,6±0,2 \*# |

Примітки:\* - р<0,05 відносно фону; # - р<0,05 відносно контрольної патології; €- р<0,05 відносно тіотриазоліну; &- р<0,05 відносно цитиколіну;°- р<0,05 відносно корвітину.

Встановлено, що мелатонін, цитиколін, корвітин та тіотриазолін достовірно не впливали на середні значення ВОТ відносно фонових значень, які зареєстрували на початку експерименту, при їх курсовому семиденному в/в введенні кролям без офтальмопатології. Це доводить, що досліджувані препарати можна застосовувати не зважаючи на те яким ВОТ супроводжується та чи інша офтальмопатологія.

Оскільки контузійна травма ока супроводжується порушеннями реґіонарної гемодинаміки на рівні мікроциркуляторного русла (Зеленцов С. Н., 2014; Иваницкая Е. В., Перетягина Д. О., 2012), було доцільним дослідити притаманну йому вазотропну дію та оцінити спроможність до нормалізації локальної гемодинаміки. Така фармакодинамічна властивість мелатоніну на судини очного яблука при травмі вивчався вперше. Нами встановлено, що весь постконтузійний період характеризувався суттєвим порушенням мікроциркуляції ока, яке знайшло своє віддзеркалення у вірогідному падінні абсолютних значень коефіцієнта мікроциркуляції в середньому в 5,1, 13,5 та 8,7 рази, відповідно на 1-шу, 4-ту та 7-му добу експерименту (табл. 4). Максимальне зниження досліджуваного показника у тварин групи контрольної патології відбулось на 4-ту добу після моделювання травми, що свідчить про пік гіпоперфузії очного яблука (критичний період), оскільки вже на 7-му добу відмічено вірогідний підйом коефіцієнта мікроциркуляції відносно 4-ої доби. Цей феномен можна пояснити розкриттям колатералей та розвитком адаптації зорового аналізатора до умов постконтузійного періоду. Однак, незважаючи на це, в кінці експерименту коефіцієнт мікроциркуляції в циліарному тілі залишався нижчим відносно першої доби та фону, що свідчить про суттєву гіпоперфузію навіть через 7-м діб після моделювання контузії.

*Таблиця 4*

**Динаміка мікроциркуляторних змін у судинах циліарного тіла кролів у постконтузійний період на тлі курсового введення мелатоніну, цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну (М±m, n=10)**

|  |  |
| --- | --- |
| Група тварин | Коефіцієнт мікроциркуляції, в ум. од. |
| Фон | 1 доба | 4 доба | 7 доба |
| Контрольна патологія | 12420,6±55,5 | 2455,2±44,9 \* | 922,2±15,1 \* | 1433,6±35,6 \* |
| МКО + мелатонін, 10 мг/кг | 12846,9±49,4 | 9370,9±58,0 \*#€°& | 6541,2±80,5 \*#€°& | 10210,2±34,7 \*#€°& |
| МКО + цитиколін, 250 мг/кг | 12471,2±66,3 | 5460,4±60,6 \*#€ | 1916,6±24,7 \*#€ | 2411,8±54,5 \*#€ |
| МКО + корвітин, 10 мг/кг | 12588,1±63,0 | 7637,0±60,2 \*#€& | 3101,6±58,4 \*#€& | 6460,8±63,9 \*#€& |
| МКО + тіотриазолін, 100 мг/кг | 12236,8±49,4 | 4317,3±44,7 \*# | 1567,3±21,6 \*# | 2029,7±19,9 \*# |

Примітки:\* - р<0,05 відносно фону; # - р<0,05 відносно контрольної патології; €- р<0,05 відносно тіотриазоліну; ° - р<0,05 відносно корвітину; & - р<0,05 відносно цитиколіну.

За даними лазерної доплерівської флоуметрії, курсове застосування мелатоніну, цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну стабілізувало стрімке погіршення кровопостачання, проте, за ступенем покращання перфузії, вони мали між собою вірогідну різницю. За показником мікроциркуляції, мелатонін достовірно перевершував найбільш активний препарат-порівняння корвітин на 1-шу, 4-ту та 7-му добу в середньому на 18,5%, 52,6% та 36,7% (р<0,05). Слід відмітити, що саме у критичний період (4-та доба) відмічалась максимальна різниця в ефективності мелатоніну над корвітином.

Встановлено, що мелатонін в умовах МКО блокує розвиток оксидативного стресу та відновлює енергопостачання в сітківці, і, як наслідок, стабілізує знижений ВОТ та відновлює циліарну перфузію на мікроциркуляторному рівні, зменшує в сироватці крові активність NSE та рівень S100 (обмежує нейроцитодеструкцію), гальмує апоптоз (в сітківці, рогівці та кришталику) та нейрогліальну проліферацію. В основі механізму нейропротекторної дії мелатоніну в умовах МКО лежить нормалізація АФК/NO-залежних механізмів вазоконстрикції та апоптозу, зменшення АФК-залежних механізмів пошкодження енергопродукуючих функцій мітохондрій та зменшення АТФ-залежної ексайтотоксичності.

Результати експериментально обґрунтовують доцільність застосування мелатоніну в терапії тупих травм ока, створення його нової лікарської форми з метою впровадження в офтальмологічну практику за новим призначенням, а саме як нейропротектора при контузійній травмі органу зору.

# ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні на підставі експериментальних досліджень обґрунтовано доцільність застосування мелатоніну в якості засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень в зоровому аналізаторі за умов його контузійного ушкодження.

1. Моделювання експериментальної контузії важкого ступеню за власно розробленою методикою, дією потоку вуглекислого газу під тиском при холостому пострілі із пневматичного пістолету впритул до центру рогівки ока кролів, супроводжувалась типовими для клініки контузійної травми органу зору патобіохімічними та морфо-функціональними змінами в структурах зорового аналізатора. Так, весь постконтузійний період (1-7 доба) супроводжувався суттєвим порушенням мікроциркуляції (падіння коефіцієнта мікроциркуляції у 5,1-8,7 рази), стабільно зниженим внутрішньоочним тиском (у 2,7 рази), активацією оксидативного стресу (зріс рівень МДА у 2,43 рази, КГП у 2,62 рази, знизилась активність ГПО в 1,73 рази), дисбалансом у функціонуванні системи NO (зріс рівень нітритів та нітратів у 3,47 рази), експресією нейрон-специфічної енолази (в 43,3 рази) та білку S 100 (в 39,7 рази), високим рівнем апоптозу як в клітинах сітківки, так і ендотелію рогівки та епітелію кришталика (зріс рівень маркеру відповідно у 14,7, 4,22 та 11 рази), при мікроскопії гістопрепаратів зорового нерва візуально помічені явища деструкції та нейродегенерації.
2. Експериментально обґрунтовано умовно-терапевтичну дозу мелатоніну на моделі контузійної травми зорового аналізатора за показниками нейрон-специфічної енолази та внутрішньоочного тиску - 10 мг/кг двічі на добу внутрішньовенно. Встановлено, що нейроретинопротекторна дія мелатоніну (10 мг/кг) за зниженням активності нейрон-специфічної енолази та титру білку S 100 вірогідно перевершила аналогічний ефект цитиколіну відповідно на 9% та 20,7%, корвітину на 20,2% та 31,5%, тіотриазоліну на 23,9% та 39,3% (р<0,05).
3. Курсове семиденне внутрішньовенне введення мелатоніну, дозою 10 мг/кг, сприяло зменшенню проявів апоптозу, що проявилось вірогідним зменшення відсотку клітин сітківки, ендотелію рогівки та епітелію кришталика із фрагментованою ядерною ДНК відповідно на 52,1-72,4%% (р<0,05), а також зменшенню нейрогліопроліферативної активності, що проявилось зменшенням відсотку ядер в суспензії клітин сітківки у фазі S клітинного циклу, на 54,7% (р<0,05). Мелатонін обмежує як некробіотичні, так і апоптотичні процеси в сітківці при модельній контузії, що є одним із механізмів його нейропротекторної дії.
4. Встановлено, що мелатонін за умов контузії ока відновлює енергетичний метаболізм сітківки (АТФ на 83,1%), зменшує явища глутаматної ексайтотоксичності (глутамат на 26,8%), відновлює баланс у функціонуванні системи NO (стабільні метаболіти NO на 50,8%), зменшує прояви оксидативного стресу (МДА на 47,9%, КГП на 47,2%, ГПО на 54,5%) (р<0,05).
5. Весь постконтузійний період (1-7 доба) мелатонін стабілізував стрімке погіршення циліарної мікроциркуляції, з мінімальним проявом ефекту на 4-ту добу, та нормалізував знижений внутрішньоочний тиск, з максимальним проявом ефекту на 7-му добу після моделювання контузійної травми, при цьому не мав впливу на цей же показник при нормотонусі (без офтальмопатології), що доводить можливість застосування мелатоніну не зважаючи на те яким внутрішньоочним тиском супроводжується та чи інша офтальмопатологія.
6. Мелатонін по таким показникам як коефіцієнт мікроциркуляції, внутрішньоочний тиск, нейрон-специфічна енолаза та білок S 100 достовірно перевершує цитиколін, корвітин та тіотриазолін, за показниками рівня карбонільних груп протеїнів, малонового діальдегіду, глутатіонпероксидази, нітритів та нітратів, глутамату та АТФ достовірно перевершує цитиколін і корвітин, за показниками нейрогліальної проліферації та апоптозу в сітківці достовірно перевершує цитиколін, а за показником апоптозу в ендотелію рогівки та епітелію кришталика достовірно перевершує тіотриазолін.
7. Нейропротекторна дія мелатоніну при контузійній травмі зорового аналізатора ґрунтується на перериванні АФК/NO-залежних механізмів структурно-функціональних пошкоджень зорового аналізатора та направлено на зменшення вазоконстрикції, покращення енергопродукуючих функцій мітохондрій, зменшення апоптозу та нейрогліопроліферації.

# СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Черешнюк, І. Л., Комнацька, К. М., Повх, В. Л., & Ходаківський, О. А. (2015). Комплексний підхід до доклінічної оцінки безпечності нейроретинопротекторів при різних шляхах введення. *Вісник морфології*, *21*(2), 379-385. *(Особистий внесок: проведення експерименту та визначення фонових (фізіологічних) величин активності та рівнів нейромаркерів у інтактних тварин та показників клітинного циклу із використанням методу протокової цитометрії, участь у формулюванні висновків та підготовці статті до друку)*.
2. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., Ходаківський, О. А., & Прокопенко, С. В. (2016). Скринінг наявності та порівняльна оцінка величини нейроретинопротекторного ефекту cеред деяких препаратів з антиоксидантною дією або модулювальною активністю на формування глутаматної ексайтотоксичності. *Світ медицини та біології*, *58*(4), 105-109. *(Особистий внесок: літературний пошук, виконання експериментальної частини, оцінка отриманих результатів дослідження, участь у формулюванні висновків, оформлення публікації до друку)*.
3. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., Ходаківський, О. А., & Мельник, А. В. (2017). Характеристика внутрішньоклітинних (метаболітотропних) механізмів нейроретинопротективної активності мелатоніну при терапії модельної контузії зорового аналізатора. *Буковинський медичний вісник*, *21*(2), 19-23. *(Особистий внесок: аналіз наукових літературних джерел, виконання експериментальної частини, систематизація, обробка та аналіз отриманих результатів, подача статті до друку).*
4. Комнацька, К. М., Ходаківська, О. В., Черешнюк, І. Л., & Ходаківський, О. А. (2017). Експериментальна оцінка впливу нарізного введення мелатоніну, цитиколіну, корвітину та тіотриазоліну на мікроциркуляцію в судинах циліарного тіла кролів після контузії ока за даними лазерної доплерівської флоуметрії. *Медична та клінічна хімія, 19*(2), 88-94. *(Особистий внесок: проведення експерименту та дослідження мікроциркуляції, оформлення публікації до друку)*.
5. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., & Ходаківський, О. А. (2017). Порівняльний аналіз впливу мелатоніну у різному діапазоні доз та деяких цитопротекторів на динаміку внутрішньоочного тиску у кролів в нормі та за умов контузії ока. *Biomedical and biosocial anthropology,* (28), 27-31. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних джерел, проведення експерименту та дослідження внутрішньоочного тиску тонометром ICARE, участь у формулюванні висновків, оформлення публікації до друку)*.
6. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., Ходаківська, О. В., & Ходаківський, О. А. (2017). Порівняльна оцінка антиапоптотичної та антинейрогліопроліферативної активності у мелатоніну та цитиколіну на клітини сітківки при контузійній травмі ока за даними протокової цитометрії. *Biomedical and biosocial anthropology,* (29), 15-20. *(Особистий внесок: проведення експерименту та протоково-цитометричного аналізу, комплексна оцінка та аналіз отриманих результатів дослідження, участь у формулюванні висновків, оформлення та подача статті до друку)*.
7. Черешнюк, І. Л., Повх, В. Л., Комнацька, К. М., & Ходаківський, О. А. (2016). Патент на корисну модель 109424 Україна. *Застосування цитопротекторів, вибраних з ряду цитиколіну, мелатоніну, мексидолу, корвітину, тіотриазоліну та розчину сульфату магнію, як нейроретинопротекторів.* Київ: Державне патентне відомство України.
8. Черешнюк, І. Л., Комнацька, К. М., Повх, В. Л., & Ходаківський, О. А. (2016). Патент на корисну модель 109789 Україна. *Спосіб моделювання контузії ока для скринінгової оцінки нейроретинопротекторної активності лікарських засобів та біологічно активних сполук.* Київ: Державне патентне відомство України.
9. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., & Ходаківський, О. А. (2016). Вплив парентерального застосування мелатоніну на перебіг нейродеструктивних процесів в сітківці та зоровому нерві при експериментальній травмі ока у кролів. *Перший крок в науку-2016: тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, м. Вінниця, Україна, 7-8 квітня, 2016.* Вінниця: ВНМУ.
10. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., & Ходаківський, О. А. (2016). Патогенетичне обґрунтування доцільності використання мелатоніну в якості цитопротектора при контузійній травмі ока. *Філатовські читання‒2016: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Одеса, Україна, 19-20 травня 2016.* Одеса.
11. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., & Ходаківський, О. А. (2016). Оцінка ефективності парентеральної терапії мелатоніном експериментальної контузії зорового аналізатора за рівнем маркера нейропроліферативних процесів. *Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи: Матеріали VІІІ Національного з’їзду фармацевтів України, м. Харків, Україна, 13-16 вересня 2016*. Харків.
12. Комнацька, К. М., Черешнюк, І. Л., Ходаківський, О. А., & Прокопенко, С. В. (2016). Фрагментація ядерної ДНК клітин сітківки після контузійної травми ока на тлі застосування екзогенного мелатоніну у кролів. *Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології: Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, пам’яті професора В. В. Дунаєва. м. Запоріжжя, Україна, 24‒25 листопада 2016*. Запоріжжя: ЗДМУ.
13. Ходаківський, О. А., Ходаківська, О. В., Петрик, О. І., Погоріла, А. В., Повх, В. Л., & Комнацька, К. М. (2017). Можливість використання нейро- та кардіомаркерів для фармакологічного скринінгу органопротекторів. *V Національний з’їзд фармакологів України, м. Запоріжжя, Україна, 18‒20 жовтня 2017.* Запоріжжя: ЗДМУ.
14. Ходаківський, О. А., Черешнюк, І. Л., Ходаківська, О. В., Комнацька, К. М., Петрик, О. І., Повх, В. Л. … Редькін, Р. Г. (2017). Застосування комплексного патогенетично-обґрунтованого підходу до вивчення ефективності потенційних цитопротекторів при ішеміко-гіпоксичному, токсичному або травматичному ураженні серця, печінки, нирок, органа зору, центральної та периферичної нервової системи (нерви щелепно-лицьової ділянки). *Сучасні аспекти клінічної фармакології на тлі досягнень доказової медицини України: Матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Вінниця, Україна, 16–17 листопада 2017*. Вінниця: ВНМУ.

# АНОТАЦІЯ

**Комнацька К. М. Нейропротективні ефекти мелатоніну при контузійній травмі ока (експериментальне дослідження). ‒ На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія. – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2018.

В дисертаційній роботі вперше здійснено доклінічну оцінку ефективності мелатоніну в якості засобу фармакокорекції структурно-функціональних порушень в органі зору за умов його контузії на власно створеній моделі контузійного ураження зорового аналізатора у кролів. Вперше на моделі контузії ока показано, що семиденне курсове введення мелатоніну, дозою 10 мг/кг двічі на добу внутрішньовенно, сприяє прояву антинейрогліопроліферативної дії та антиапоптотичної дії препарату в клітинах сітківки, рогівки та кришталика. Вперше показано, що мелатонін (10 мг/кг) не впливає на середні значення внутрішньоочного тиску у кролів без офтальмопатології, а за умов постконтузійної гіпотонії – підвищує знижений тиск. Вперше досліджено кровоплин в судинах циліарного тіла ока в динаміці його контузійної травми та встановлено, що мелатонін сприяє відновленню циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні. Вперше встановлено, що механізми нейропротекторної дії мелатоніну при контузії органу зору реалізуються за рахунок зменшення в крові активності нейрон-специфічної енолази та рівня білку S 100, зменшення маркеру апоптозу в сітківці, ендотелію рогівки та епітелію кришталика, зменшення маркеру нейрогліальної проліферації, зниження в сітківці рівня карбонільних груп протеїнів, малонового діальдегіду, нітритів та нітратів, глутамату та підвищення рівня АТФ і глутатіонпероксидази, підвищення зниженого показника внутрішньоочного тиску та відновлення циліарної перфузії на мікроциркуляторному рівні.

**Ключові слова:** мелатонін, контузійна травма ока, зоровий аналізатор, нейропротектор, апоптоз, внутрішньоочний тиск, мікроциркуляція, нейропротекція, нейрон-специфічна енолаза, білок S 100, оксидативний стрес.

**SUMMARY**

**Komnatska K. M. Neuroprotective effects of melatonin in case of eye contusion injury (experimental study). – Qualification scientific work with the manuscript copyright.**

The thesis for a candidate of medical science degree in speciality 14.03.05 - pharmacology. – State enterprise "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, 2018.

Equivocal an insufficient treatment results for visual analyzer injuries that have traumatic genesis and associate with the high levels of patient disability, are related to the absence of successful neuroprotectors which can effectively influence on all components of patho-biochemical cascade in retina and other structures of the eye, where morpho-functional integrity provides realization of visual functions, and provide rationale for medical and social importance of the invention and implementation of the drugs in this class. Melatonin possesses well known and deeply investigated pharmacological activities, that working in combination provide a fundament for its efficacy in eye ischemia and can become an important component for efficacy of the drug also in traumas. These are anti-hypoxic activity, antioxidant action, energy modulating effect, endothelioprotective effect, modulating effect on nitrogen monoxide system function, anti-neurotoxic and neuroprotective effects, antiapoptotic and antiproliferative effects, anxiolytic and actoprotective effects (the last is especially important in traumas). Therefore, due to described pharmacodynamic specter that is possessed by melatonin, and considering its potential targeting on the main pathogenetic components of traumatic cascade in retina, the rationale for the further experimental pre-clinical studies for investigation of its efficacy in visual analyzer traumas is reasonably sufficient.

We have completed the model of contusional injury of the visual analyzer, developed classification that reflects the quantitative levels of its neurogenic structures injury. This standardized model provides simulation of the eye contusion in rabbits, which is caused by the carbon oxide gas pressurized stream during the shot from pneumatic gun in narcosis condition. In front of this, using the specific sensitive serum neuromarkers (NSE and S100) the development of classification for the severity of trauma relating to distance of the shot, became possible. Implementation and patenting of the original model for eye contusion in rabbits, caused by the action of pressurized carbon dioxide gas stream, allows to perform the target search of neuroretinoprotective activity in wide spectrum of biologically active compounds and medicinal products, for which this activity was not detected before.

Thereafter, the conditionally-effective neuroprotective dose of melatonin was detected as 10 mg/kg intravenously 2 times/day, which provides realization of protective effect on retina by the level of neuron-specific enolase activity decrease, that is probably better than the analogic action of referent citicoline (250 mg/kg), corvitin (10 mg/kg), or thiotriazoline (100 mg/kg). The multi-vectoral mechanisms of melatonin protective action on the eye in front of its contusion were detected, and the pharmacodynamics aspects that are realized in these conditions were found. Thus, it was shown for the first time that the seven-day course treatment for the eye contused rabbits with melatonin in dose of 10 mg/kg, supported the realization of antiapoptotic action of the drug which prevailed by this parameter over referent citicoline and thiotriazoline to the retinal cells, posterior corneal epithelium and lens epithelium. It was experimentally proved that anti-neuroglioproliferative effect of melatonin, that prevailed on average by 1,8 times over the same action of citicoline, that was verified using the serum marker S100 and the cytometry criterion for assessment of percentage ratio of the cells with DNA in S-phase of the cell cycle, respectively. The functional extracellular effects of melatonin on the eye in front of contusion were summarized for the first time. Thus, for the first time it was shown that melatonin in the wide dose range (5-15 mg/kg) amortized the decrease of intraocular pressure, prevailing over efficacy of the reference drugs citicoline, corvitin, or thiotriazoline. It was proved for the first time that stimulating activity of melatonin on the microcirculation in the ciliary body of the eye in rabbits, probably prevailed over the effect of the most active comparator drug corvitin on the 1st, 4th, and 7th day of the therapy in average by 18,5%, 52,6% and 36,7% (р<0,05).

The results provide experimental rationale for the reasonability of production prototype development for the melatonin formulation for parenteral administration and the further clinical assessment of its protective action on the eye, which aims implementation of the drug into the practical system of public health with its new indication, namely as neuroprotector for contusion eye trauma. It was first established that the mechanisms of neuroprotective action of melatonin in conjunctiva of the organ of vision are realized by reducing the activity of the neuron-specific enolase and the level of protein S100 in the blood, decreasing the marker of apoptosis in the retina, corneal endothelium and epithelium of the lens, decreasing the marker of neuroglial proliferation, decreasing in the retina level carbonyl groups of proteins, malondialdehyde, nitrites and nitrates, glutamate and increased levels of ATP and glutathione peroxidase, an increase in the lowered intraocular pressure and renewal of ciliary perfusion at the microcirculatory level. The obtained results significantly widen the knowledge about the place and role of cytoprotectors in the therapy of the visual analyzer injuries of traumatic genesis.

**Key words:** melatonin, ocular blunt (contusion) trauma, visual analyzer, neuroprotector, apoptosis, intraocular pressure, microcirculation, neuroprotection, neuron-specific enolase, protein S 100, oxidative stress.

**АННОТАЦИЯ**

**Комнацкая Е. Н. Нейропротективные эффекты мелатонина при контузионной травме глаза (экспериментальное исследование). ‒ На правах рукописи.**

 Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.05 ‒ фармакология. - ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев, 2018.

В диссертационной работе впервые осуществлено доклиническую оценку эффективности мелатонина в качестве средства фармакокоррекции структурно-функциональных нарушений в органе зрения в условиях его контузии на собственно созданной модели контузионного поражения зрительного анализатора у кролей. Впервые на модели контузии глаза показано, что семидневное курсовое введение мелатонина, в дозе 10 мг/кг дважды в сутки внутривенно, способствует проявлению антинейроглиопролиферативного действия и антиапоптотичного действия препарата в клетках сетчатки, роговицы и хрусталика. Впервые показано, что мелатонин (10 мг/кг) не влияет на средние значения внутриглазного давления у кроликов без офтальмопатологии, а в условиях постконтузионной гипотонии - повышает пониженное давление. Впервые исследован кровоток в сосудах цилиарного тела глаза в динамике его контузионной травмы и установлено, что мелатонин способствует восстановлению цилиарной перфузии на микроциркуляторном уровне. Впервые установлено, что механизмы нейропротекторного действия мелатонина при контузии органа зрения реализуются за счёт уменьшения в крови активности нейрон-специфической энолазы и уровня белка S 100, уменьшения маркера апоптоза в сетчатке, эндотелии роговицы и эпителии хрусталика, уменьшения маркера нейроглиальной пролиферации, снижения в сетчатке уровня карбонильных групп протеинов, малонового диальдегида, нитритов и нитратов, глутамата и повышения уровня АТФ и глутатионпероксидазы, повышения сниженного показателя внутриглазного давления и восстановления цилиарной перфузии.

**Ключевые слова:** мелатонин, контузия глаза, зрительный анализатор, нейропротектор, апоптоз, внутриглазное давление, микроциркуляция, нейропротекция, нейрон-специфическая энолаза, белок S100, оксидативный стресс.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| АТФ | - | аденозинтрифосфорна кислота; |
| в/в | - | внутрішньовенно; |
| ВНМУ | - | Вінницький національний медичний університет; |
| ВОТ | - | внутрішньоочний тиск; |
| ГПО  | - | глутатіонпероксидаза; |
| ДНК | - | дезоксирибонуклеїнова кислота; |
| ЗН | - | зоровий нерв; |
| КГП | - | карбонільні групи протеїнів; |
| КП | - | контрольна патологія; |
| МДА | - | малоновий діальдегід; |
| МКО | - | модельна контузія ока; |
| МОЗ | - | Міністерство охорони здоров’я; |
| ОМБ | - | окисна модифікація білка; |
| ПОЛ | - | перекисне окиснення ліпідів; |
| NО | - | монооксид азоту; |
| NSE | - | нейрон-специфічна енолаза; |
| S100 | - | білок S 100. |

Підписано до друку 00.00.2018. Гарнітура TimesNewRoman

Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,00

Наклад – 100 прим. Замовлення № .

Надруковано з оригінал-макету в типографії

XXX

XXXXXXXX, м. Вінниця, вул. ХХХХХХХ, ХХ.