МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(повне найменування інституту, назва факультету )

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Кафедра промислової фармації \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(повна назва випускової кафедри)

РЕФЕРАТ

до дипломної магістерської роботи (проєкту)

на тему

«Дослідження ефектів нейротрофіну GDNF як потенційної фармацевтичної субстанції з нейропротекторними властивостями»

Виконав: студент групи\_\_ МгХФ-19 \_

спеціальності

\_«Фармація, промислова фармація»\_\_

(шифр і назва спеціальності)

Литвин Т.О.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Керівник \_\_ Кулик В.Б.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Рецензент\_\_\_\_ Кузьмина Г.І.\_\_\_\_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Київ – 2020

**Актуальність теми.**

Ішемічне ураження головного мозку займає одне з перших місць серед нейро-судинних захворювань з високим відсотком смертності та інвалідизації населення. Ішемія – багатофакторний патологічний процес, що залучає значні морфофункціональні та метаболічні зміни порушення синаптичної передачі, активація вільно-радикальних процесів, ексайтотоксичність і ін. У зв'язку з цим величезне значення набуває пошук нейропротекторних сполук, що здатні активувати репаративні процеси у віддаленому постішемічному періоді.

В даний час, перспективним є застосування речовин ендогенного походження для коректорів ішемічного ушкодження. В якості цільових ендогенних сполук можуть розглядатися нейротрофічні чинники - регуляторні білки, які відіграють ключову роль у функціонуванні центральної нервової системи. Одним з таких представників є гліальний нейротрофічний фактор (GDNF), що сприяє збереженню та диференціації різних популяцій клітин центральної і периферичної нервової системи.

На сьогодні весь спектр нейропротекторних властивостей GDNF, а також механізми їх реалізації недостатньо розкриті. Показана можливість GDNF впливати на синаптичну пластичність, регулювати утворення синаптичних закінчень та їх функціональні властивості через стимуляцію синтезу GluR2-субодиниць AMPA-рецепторів. У дослідженнях присвячених гіпоксії/ішемії показана здатність GDNF знижувати негативний вплив на клітини шляхом часткової блокади глутаматної ексайтотоксичності, пригнічення роботи каспаз і активації генів раннього реагування.

Таким чином, вивчення механізмів нейропротекторної і антигіпоксичної дії нейротрофічних факторів, зокрема GDNF, представляє фундаментальну основу для створення терапевтичної стратегії в корекції ушкоджень головного мозку.

**Метою дослідження** полягає у вивченні нейропротекторної дії гліального нейротрофічного фактора (GDNF), як перспективної фармацевтичної субстанції при моделюванні гіпоксії та глюкозної депривації.

**Об'єктом** дослідження є антигіпоксичний та антигіпоглікемічний ефекти гліального нейротрофічного фактора.

**Предметом дослідження** є пошук перспективних фармацевтичних субстанцій пептидної природи з нейропротекторними властивостями.

**Методи дослідження:** культивування нервових клітин, глюкозна та киснева депривація, поведінкові тести, математична статистика.

**Основні конструктивні**, **технологічні та інші характеристики та показники.** Отримані результати розширюють існуючі знання про нейропротекторні ефекти, що викликані впливом GDNF на нервову систему.

Показано, що при моделюванні основних факторів ішемії (гіпоксії і глюкозної депривації) in vitro превентивне введення GDNF підвищує життєздатність клітин культури, сприяє збереженню функціональної активності і внутрішньої структури нейронних мереж. Підвищення стійкості тварин в умовах кисневої недостатності також свідчить про наявність у GDNF нейропротекторних властивостей.

**Отримані результати**.

Ішемічне пошкодження - це складний багатостадійний і багатофакторний стан, що призводить до ушкодження тканин в результаті впливу гіпоксії та глюкозної депривації. Порушення кисневого і субстратного забезпечення веде до значних змін морфофункціонального стану нейронних мереж головного мозку.

Для виявлення потенційної захисної дії гліального нейротрофічного фактора від ішемічного пошкодження проводилося вивчення нейропротекторних ефектів, що властиві GDNF при моделюванні кожного лімітуючого фактора окремо.

**Вплив GDNF на життєздатність клітин первинної культури гіпокампу при моделюванні глюкозної депривації in vitro.**

Дослідження життєздатності клітин проводили на 1, 3 і 7 день після моделювання глюкозної депривації з метою визначення нейропротекторних ефектів в довгостроковому періоді.

Морфологічні зміни в контрольній групі спостерігали, починаючи з першої доби після впливу, вони виявлялися в появі некротизованих клітин, число яких поряд з апоптотичними тілами переважали до 7 дня після моделювання глюкозної депривації. При цьому слід зазначити відсутність як морфологічних, так і статистично достовірних змін за кількістю мертвих клітин при оцінюванні життєздатності в інтактній групі протягом усього періоду дослідження .

Отже, проведені експерименти показали, що двогодинна глюкозна недостатність призводить до підвищення числа мертвих клітин в культурі. Найбільший ефект спостерігається на 7 день дослідження, до цього часу гине велика частина клітин культури. Превентивне застосування GDNF спричиняє протекторну дію на клітинну культуру, в даній групі не було виявлено достовірних відмінностей з інтактною групою за кількістю мертвих клітин.

**Вплив GDNF на життєздатність клітин первинної культури гіпокампу при моделюванні нормобаричної гіпоксії in vitro.**

Оцінка життєздатності клітин первинної культури гіпокампу проводилася на 1, 3 і 7 день постгіпоксичного періоду. Результати показали, що 10-хвилинна гіпоксія викликає різке збільшення кількості мертвих клітин вже на першу добу. Протягом наступних 7 днів кількість некротизованих і апоптотичних елементів тільки зростає. Превентивне застосування GDNF (1 нг/мл) істотно знижує негативні наслідки гіпоксії, підвищуючи життєздатність клітин .

Отже, гіпоксія викликає різке збільшення кількості мертвих клітин вже на першу добу. Превентивне застосування GDNF знижує негативні ефекти гіпоксії, кількість нежиттєздатних клітин в даній групі достовірно нижча, ніж у контрольній групі і не відрізняється від показників інтактної групи.

**Вплив GDNF на експресію мРНК GluR2 при моделюванні гіпоксії**

Одним з факторів мозкового ураження при гіпоксії/ішемії є глутаматна ексайтотоксичність. У розвиток ексайтотоксичністі роблять внесок в тому числі і AMPA-рецептори, у складі яких немає GluR2-субодиниці, через збільшення кальцієвої проникності клітин і запуск нейротоксичних ефектів. GDNF здатний контролювати синтез GluR2-субодиниці шляхом впливу на траскрипцію. Отже, ми вивчали вплив GDNF на експресію мРНК GluR2-субодиниці AMPA-рецептора в нормі і при моделюванні гіпоксії.

Для досягнення даної мети був застосований метод прижиттєвої детекції мРНК, який дозволяє виявити зміну рівня експресії гена під дією різних факторів . Для контролю Ca-метаболізму клітин і виявлення їх морфології використовували флуоресцентний, кальцій-чутливий барвник - Oregon Green.

Результати досліджень показали, що гостра гіпоксія викликає зниження кількості клітин, що експресують мРНК GluR2, більш ніж в 1,8 рази. Превентивне введення GDNF сприяє збереженню кількості клітин, що експресують мРНК GluR2 на рівні норми .

Отже, GDNF в умовах гіпоксії чинить нейропротекторну дію, підтримуючи експресію мРНК GluR2-субодиниці AMPA-рецептора, тим самим стримуючи ексайтотоксичну дію глутамату.

Для верифікації даних отриманих in vitro, наступним етапом наших досліджень стало вивчення захисної дії GDNF на більш високому системному рівні, а саме вплив GDNF на адаптацію, виживаність, збереження просторової пам'яті в умовах гострої гіпобаричної гіпоксії.

**Вплив GDNF на виживаність тварин при моделюванні гострої гіпобаричної гіпоксії in vivo.**

При аналізі антигіпоксичної дії GDNF важливим етапом є оцінка такого параметра як виживаність тварин при моделюванні гіпоксії, яке визначається як частка тварин, які витримали перебування на «смертельному майданчику» протягом 10 хвилин від загального числа тварин в групі .

З цього випливає, що превентивне інтраназальне введення GDNF у низькій концентрації сприяє підвищенню виживаності тварин в умовах гіпобаричної гіпоксії. Виживання мишей групи із застосуванням GDNF у низькій концентрації в 2 рази вище, ніж у контрольній групі з попереднім інтраназальним введенням фізіологічного розчину.

**Вплив GDNF на показники рухової та орієнтувально-дослідницької активності мишей в тесті «Відкрите поле».**

Одним із способів дослідження поведінкових реакцій є тест «відкрите поле», де досліджується рухова і орієнтувально-дослідницька поведінка мишей у стресовому стані.

В наших експериментах превентивне введенням GDNF в концентраціях 4 і 40 мкг / кг сприяє збереженню високої рухової активності тварин (рис. 6). Отже, застосування GDNF (4 і 40 мкг/кг) справляло позитивний регулюючий вплив на функціональний стан ЦНС тварин в умовах гострої гіпоксії, частково усувало стресорний вплив останньої і підвищувало адаптаційні можливості організму.

**Висновки.**

1. Нейропротекторні ефекти превентивного введення GDNF (1 нг/мл) у віддаленому постгіпоксичному періоді пов'язані з підтриманням життєздатності клітин первинної культури гіпокампу при моделюванні гіпоксії і глюкозної депривації in vitro.
2. Превентивне застосування GDNF в концентрації 1 нг/мл знижує негативні ефекти гіпоксії: кількість нежиттєздатних клітин в даній групі достовірно нижча, ніж у контрольній групі і не відрізняється від показників інтактної групи.
3. Превентивне інтраназальне введення GDNF у низькій концентрації сприяє підвищенню виживаності тварин в умовах гіпобаричної гіпоксії. Виживання мишей групи із застосуванням GDNF у низькій концентрації в 2 рази вище, ніж у контрольній групі з попереднім інтраназальним введенням фізіологічного розчину.
4. Інтраназальне введення GDNF (4 і 40 мкг/кг) підвищує стійкість тварин до дії гострої гіпобаричної гіпоксії in vivo, сприяє збереженню рухової і дослідницької активності в постгіпоксичний період.
5. Отримані результати вказують на потенційну ефективність застосування GDNF як антигіпоксанту в умовах гострої гіпобаричної гіпоксії нарівні із застосуванням антигіпоксанту реамберину.

**Рекомендації щодо використання одержаних результатів.** Результати демонструють вийняткову роль даного нейротрофічного фактора, як компонента ендогенної системи захисту, у функціонуванні центральної нервової системи. Подальше дослідження механізмів дії та властивостей даного нейротрофічного фактора відкриє перспективу для розробки нових, більш ефективних лікарських засобів, спрямованих на корекцію ішемічних порушень.

Дипломна магістерська робота (проект) складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел (243 найменування). Загальний обсяг магістерської роботи (проекту) 120 сторінок комп’ютерного тексту, 24 рис., 2 табл.

**Апробація результатів дослідження.**

Основні результати дипломної магістерської роботи:

- опубліковані у статті збірнику «Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин», Литвин Т.О., Кулик В.Б., назва статті: «Вплив гліального нейротрофічного фактора на резистентність тварин в умовах гострої гіпобаричної гіпоксії IN VIVO». Київ КНУТД

**Ключові слова:** *гліальний нейротрофічний фактор, ішемія, гіпоксія, глюкозна депривація, нейро- та цитопротекція.*