МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СТРИГА ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА

УДК: 615, 618, 615.256.51:615.454:57.084.1

ДИСЕРТАЦІЯ

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ КОМБІНОВАНОГО СКЛАДУ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ

22 «Охорона здоров'я»
226 «Фармація, промислова фармація»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. А. Стрига
підпис Ініціали та прізвище дисертанта

Науковий керівник
Зайченко Ганна Володимирівна,
доктор медичних наук, професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Стрига О. А. Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань — 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація». Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2021 р.

Дисертаційна робота присвячена фармакологічному вивченню нового вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, призначеного для лікування гіпоестрогенових розладів, зокрема генітоуринальних, що виникають у жінок внаслідок фізіологічного (клімактеричного) або патологічного (післякастраційного) зниження рівня статевих гормонів. У роботі наведено теоретичне та експериментальне обґрунтування доцільності розробки лікарського засобу місцевої (топічної) дії, до складу якого увійшли такі активні фармацевтичні інгредієнти, як поліфенол ресвератрол — фітоестроген (аналог природних статевих гормонів, агоніст естрогенових рецепторів), гіалуронова кислота — екзогенний аналог природного глікозаміноглікану, що входить до складу вагінального слизу та є фізіологічним зволожувачем, лубрикантом і важливим компонентом захисного бар'єру генітального тракту. Разом із допоміжними речовинами (молочною кислотою та ін.) вони утворюють оригінальну композицію, яка донині не має аналогів на фармацевтичному ринку України.

Із настанням менопаузи в організмі жінок виникають генетично запрограмовані вікові зміни, пов'язані з поступовим зниженням функції яєчників. Передчасне «виключення» яєчників, що виникає після хірургічної або фармакологічної кастрації, внаслідок синдрому виснаження яєчників після

допоміжних репродуктивних технологій, призводить до різких змін гормонального фону в жінок більш молодого віку. Різні за етіологією прояви менопаузальних розладів розвиваються на фоні дефіциту естрогенів та можуть викликати патологічний симптомокомплекс — клімактеричний синдром, що знижує якість життя жінок, є причиною розвитку остеопорозу, серцево-судинних ускладнень, порушення когнітивних функцій, метаболічних та генітоуринальних розладів [1].

Найбільш ефективним методом лікування менопаузального синдрому натепер є замісна гормональна терапія (менопаузальна гормональна терапія, МГТ), але залишаються жінки, яким застосування гормональних препаратів протипоказане, або вони припиняють їх введення внаслідок розвитку побічних реакцій. Значна частина жінок в Україні не звертається до лікаря для призначення МГТ, що пов'язано з гормонофобією або необізнаністю з питань МГТ. Ефективність та безпека МГТ залежать від своєчасного початку терапії, коли ще відкрите «терапевтичне вікно» [2]. Отже, більшість жінок повинні мати альтернативні варіанти лікування менопаузальних проявів, до яких належить системна та місцева терапія фітоестрогенами. В Україні є значна кількість лікарських засобів та дієтичних добавок, що містять фітоестрогени у вигляді пероральних лікарських форм, тоді як препаратів топічної дії, що доповнюють системні ефекти або усувають переважно генітоуринальні прояви (сухість, свербіж, подразнення слизової оболонки вагіни, диспареунію, нетримання сечі та ін.), бракує, а значний попит на них не компенсується обмеженим асортиментом лікарських засобів.

Перспективним шляхом вирішення актуального наукового завдання сучасної фармакології є розробка вагінальних лікарських засобів мультимодальної дії з фітоестрогенами, що отримані за допомогою сучасних фармацевтичних технологій та виявляють високу фармакологічну активність за умов гіпоестрогенових станів, здатних ефективно та безпечно корегувати патологічні прояви, зокрема генітоуринальні. В Україні майже відсутні

препарати вітчизняного виробництва зазначеної дії, а більша частина наявного асортименту представлена ліками іноземного виробництва [3].

Вагінальні гелі з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, що досліджувалися, були розроблені на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету (м. Харків) під керівництвом д. фарм. н., професора О. А. Рубан. У своєму складі гелі містять ресвератрол (Р), який є поліфенолом, фітоестрогеном, що не потребує попереднього метаболізму для виявлення фармакологічної дії (на відміну від ізофлавонів сої), гіалуронову кислоту (ГК) та допоміжні речовини, зокрема молочну кислоту (МК). Субстанція ресвератролу, що містить 50 % транс-ресвератролу рослинного походження, отримана з *Polygonum cuspidatum (Siebold & Zucc*.), *Рейнутрії* або *Горця японського*. Препаратом порівняння було обрано два лікарських засоби: перший — гель «Гінодек», який використовували при скринінгових дослідженнях, має два спільні компоненти (гіалуронову та молочну кислоти) з досліджуваними гелями та однакові показання до призначення. Другий препарат порівняння — крем «Колпотрофін», що був використаний на етапі поглиблених фармакологічних досліджень зразка-лідера та використовується для замісної гормональної терапії, містить проместрин — синтетичнй естроген.

При виконанні дослідної частини дисертаційної роботи використовувався комплексний підхід із залученням фармакологічних, токсикологічних, фізіологічних, біохімічних, гістологічних, імуноферментних, молекулярно-генетичних і статистичних методів дослідження.

Для обґрунтування оптимального складу вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою були проведені скринінгові дослідження чотирьох тест-зразків вагінальних гелей, що відрізнялися вмістом основної діючої речовини ресвератролу (0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %), решта усіх інгредієнтів залишалася в однаковій кількості.

Скринінгові дослідження були виконані на моделі хірургічної кастрації самок білих нелінійних щурів віком 3–6 міс. Дослідні тест-зразки вводили через 35 діб після формування патології, у лікувальному режимі, по 1 мл гелю інтравагінально, один раз на добу, протягом 28 днів. Як препарат порівняння був обраний вагінальний гель «Гінодек». Інтактні тварини (група ІК), прооперовані та неліковані тварини (група КП) були обрані як контроль. Вони отримували ізотонічний розчин хлориду натрію інтравагінально в такій самій кількості як тест-зразки, що піддавалися дослідженню. Після завершення експерименту проводили макроскопічний огляд стану слизової оболонки присінка вагіни, нижній відділ генітального тракту, оцінювали фізикальні показники (динаміку маси тіла, температуру тіла біля кореня хвоста), pH вагінального секрету, мікробіологічний пейзаж вагіни, гістологічне вивчення слизової оболонки вагіни.

За результатами проведеного скринінгового дослідження встановлено, що досліджувані гелі з Р і ГК виявилися ефективними за умов інтравагінального 28-денного введення оваріоектомованим самкам щурів, оскільки стримували підвищення маси тіла, що виникало на фоні дефіциту естрогенів, нормалізували температуру тіла біля кореня хвоста (попереджаючи прояви приливів жару), сприяли відновленню вагінального біотопу та кислого середовища вагінального секрету, запобігали розвитку атрофічних змін слизової оболонки піхви. За результатами інтегральної оцінки ефективності лікувальної дії вагінальних гелів встановлено, що оптимальний вміст Р у складі лікарської форми становить 0,5 %, оскільки за переважною більшістю показників на моделі експериментального гіпоестрогенового стану у тварин він отримав найбільшу кількість балів, тобто виявився найбільш ефективним. Дані експериментального дослідження свідчать про наявність не тільки місцевої, а й слабкої системної дії вагінальної лікарської форми комбінованого складу з Р і ГК, що обумовлюють необхідність подальшого поглибленого вивчення запропонованої композиції. Результати цього етапу дослідження стали

експериментальним обґрунтуванням доцільності розробки та всебічного вивчення вагінального гелю з фітоестрогеном Р і ГК як альтернативної гормоновмісним препаратам групи ліків для терапії патологічних гіпоестрогенових станів різного ґенезу, перш за все генітоуринальних проявів клімактеричного синдрому.

Наступним етапом стало вивчення профілю безпеки вагінального гелю комбінованого складу з Р та ГК, зокрема дослідження місцевої переносимості, гострої токсичності при одноразовому інтравагінальному (і/ваг) і внутрішньошлунковому (в/ш) введенні та хронічної токсичності гелю при багаторазовому (90-денному) інтравагінальному введенні щурам.

Встановлено, що вагінальний гель із Р та ГК не викликає місцевого подразнення за умов одноразового та тривалого вагінального застосування. Результати вивчення гострої токсичності гелю з Р та ГК дозволяють віднести його до нетоксичних речовин, а саме — V класу токсичності (практично не токсична речовина) за класифікацією К. К. Сидорова [4]. Дані щодо тривалого і/ваг введення свідчать про відсутність загального токсичного впливу на тварин та місцевоподразнювальної дії з боку слизової оболонки нижнього відділу генітального тракту.

Поглиблене фармакологічне вивчення фармакодинаміки вагінального гелю з Р та ГК було проведене на двох моделях, що максимально наближалися до клінічних умов розвитку гіпоестрогенових станів.

На моделі білатеральної оваріоектомії (хірургічної кастрації) було досліджено фармакологічну дію вагінального гелю на місцеві (генітоуринальні) та системні прояви гіпоестрогенії.

Показано, що при 28-денному введенні лікувальна дія гелю з Р та ГК проявлялася уповільненням темпів приросту маси тіла тварин. На відміну від нелікованих самок групи КП, де збільшення маси тіла склало 23 %, у тварин, що отримували лікування вагінальним гелем, після 4-х тижнів лікування приріст маси тіла становив не більше 5,96 %, а у тварин, що отримували

препарат порівняння — крем із синтетичним естрогеном проместрином, — 6,83 %. Свідченням системної лікувальної дії гелю з Р і ГК був достовірно менше виражений симптом підвищення температури біля кореня хвоста (це відповідає клімактеричному симптому припливів жару в жінок). У тварин групи КП порівняно з інтактними самками цей показник збільшувався на 10 %, тоді як під впливом лікування гелем із фітоестрогеном він збільшувався лише на 1,0 %, а під впливом препарату порівняння — на 1,6 %. Ефективність вагінального гелю проявлялася позитивним впливом на баланс статевих гормонів, рівень естрадіолу був у 1,5 разу, а прогестерону в 1,4 разу вищим, ніж у нелікованих тварин, за виразністю терапевтичної дії гель практично не поступався ефективності топічного препарату порівняння проместрину.

Встановлено, що під впливом лікування гелем із Р та ГК найбільш виразно зменшувалися патологічні прояви гіпоестрогенії з боку слизової оболонки вагіни. За сумарним показником макроскопічних проявів гель із фітоестрогеном зменшував ознаки гіпоестрогенової атрофії з 7-балів, що відмічалося у тварин групи КП, до 2 балів, не поступаючись за ефективністю фармакологічної активності крему з естрогеном. Це корелювало з достовірним позитивним впливом вагінального гелю на структурно-функціональний стан слизової оболонки піхви, що доведено гістологічними дослідженнями, зокрема відображалося збільшенням товщини епітеліальної пластинки, появою ознак типової естрогеноподібної дії, посиленням регенеративних процесів, слизеутворенням та відновленням рівня pH вагінального секрету до рівня фізіологічних значень (4,4–4,5).

Морфологічне дослідження стану серцевого м’яза та кісткової системи дозволили виявити протективний вплив вагінального гелю з Р та ГК та його здатність стримувати розвиток дегенеративних змін у міокарді, суглобовому хрящі та субхондральній трабекулярній кістці, що виникали у нелікованих самок щурів із дефіцитом естрогенів. За здатністю усувати генітальні прояви

гіпоестрогенії, кардіо- та хондропротекторним впливом гель із Р та ГК не відрізнявся від дії топічного препарату порівняння проместрину.

На моделі фармакологічної кастрації самок щурів були досліджені можливі механізми нейропротективної дії гелю з Р та ГК та його вплив на поведінкові реакції, що характеризують функціональний стан ЦНС.

Методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу були визначені характер експресії основних ендогенних маркерів нейропротекції: мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos і концентрація HSP70 у цитоплазмі та мітохондріях у CA1 зони гіпокампу головного мозку самок щурів. Встановлено, що експресія мРНК HIF-1α у групі КП була на 92,2 % нижче в порівнянні з групою ІК. Також було зареєстровано зниження експресії мРНК HSP70 на 92,5 % і мРНК c-fos на 80,6 %. Імуноферментним аналізом було встановлено зниження концентрації білків теплового шоку HSP70 у мітохондріях на 61 % і цитозолі головного мозку тварин із гіроестрогенією.

При лікуванні тварин із набутим гіпоестрогеновим станом, що виникав внаслідок фармакологічної кастрації, вагінальним гелем із Р та ГК відбувалося підвищення на 150 % експресії мРНК HIF-1α мРНК HSP70 на 33 % і на 200 % — мРНК c-fos у зоні CA1 гіпокампу. Але більш вираженого нейропротективного ефекту вдалося досягти в комбінованій терапії гелем із Р та ГК разом із внутрішньошлунковим введенням ресвератролу дозою 100 мг/кг. Топічна дія, посилена системним впливом фітоестрогену ресвератролу, приводила до значно більшої експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 и мРНК c-fos у CA1 гіпокампі тварин із гіпоестрогеновим станом у 23,0, 30,7 і 6,7 разів відповідно, наближаючи ці показники до показників тварин групи ІК або підвищуючи їх у 2,3 разу (мРНК HSP70). Комбіноване введення вагінального гелю і таблеток із ревератролом самкам щурів із гіпоестрогенемією достовірно збільшувало концентрацію HSP70 у цитозольних і мітохондріальних фракціях головного мозку на 118 і 177 % відповідно.

Курсове введення гелю в групі з Р та ГК оваріоектомованим самкам щурів сприяло нормалізації функціонального стану ЦНС: орієнтовно-дослідницької активності та зменшення проявів вегетативно-емоційних реакцій, показники яких майже досягали рівня групи інтактних тварин. Комбінована терапія гелем і таблетками з ресвератролом продемонструвала найбільш виражений психотропний ефект, який повністю усував у тварин прояви депресії, що виникали внаслідок дефіциту естрогенів. За ступенем впливу на всі досліджувальні показники стану ЦНС комбіноване введення гелю і таблеток із ревератролом достовірно перевершувало монотерапію гелем із Р та ГК та дію препарату порівняння з синтетичним естрогеном проместрином.

Отже, отримані нові наукові дані, що дозволили обґрунтувати доцільність розробки інноваційного лікарського засобу місцевої дії з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, встановити оптимальний склад лікарської форми, продемонструвати ефективність лікувальної дії на різних експериментальних моделях гіпоестрогенових станів та з'ясувати окремі механізми його нейропротективної дії.

Результати проведеного фармакологічного дослідження нового вагінального гелю з фітоестрогеном ресвератролом та гіалуроновою кислотою упроваджено в науково-дослідну роботу споріднених кафедр закладів вищої освіти України.

Ключові слова: ресвератрол, гіалуронова кислота, вагінальний гель, естрогенопо-дібна дія, гіпоестрогеновий стан, щури.

Список публікацій здобувача:

1. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Стрига, О. А., Яковлева, Н. Ю., & Рубан, О. І. (2017). Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини, 1* (135), 33–42.

(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).

2. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Стрига, О. А., & Рубан, О. І. (2017). Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини, 4* (1), 21–30. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

3. Зайченко, Г. В., Карпенко, Н. О., Стрига, О. А., & Сініцина, О. С. (2018). Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури). *Проблеми ендокринної патології, 4*, 65–74. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

4. Зайченко, Г. В., Сініцина, О. С., Карпенко, Н. О., Риженко, І. М., & Стрига, О. А. (2019). Розлади жіночого здоров'я внаслідок вікового дефіциту естрогенів та їх корекція. *Журнал Національної академії медичних наук України, 2* (25), 211–221. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

5. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Савченко, Н. В., & Стрига, О. А. (2020). Механізми кардіо- та вазопротекторної дії ресвератролу. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 14* (4), 223–234 https://doi.org/10.33250/14.04.223 *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

6. Зайченко, Г. В., Стрига, О. А., Мироненко, О. І., & Іванюк, О. І. (2020). Фармакологічне обґрунтування вибору оптимального складу нового вагінального гелю з ресвератролом і гіалуроновою кислотою. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 14* (6), 397–412. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

7. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., Савосько, С. І., & Сорокопуд, К. Ю. (2021). Дослідження фармакологічних властивостей вагінального гелю з

ресвератролом та гіалуроновою кислотою в умовах експериментального гіпоестрогенового стану у щурів. *Медична наука України, 17*(1), 61–69. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

8. Zaychenko, G. V., Stryga, O. A., Belenichev, I. F., & Sorokopud, K. Y. (2021). Influence of Different Resveratrol Dosage Forms on Indicators of Endogenous Neuroprotection in Experimental Hypoestrogenic State. Biological Markers and Guided Therapy, Vol. 8, N 1, 1–11. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

9. Іванюк, О. І., Ярних, Т. Г, Стрига, О. А, Зайченко, Г. В., & Ковалевська, І. В. (26 грудня 2019 р.). Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального. *Патент України на корисну модель* № 139105 *(Особистий внесок: участь у патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).*

10. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., & Стрига, О. А. (18–20 жовтня 2017 р.). *Теоретичне обґрунтування створення топічних препаратів на основі ресвератролу*. V Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей, м. Запоріжжя. *(Особистий внесок — брала участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

11. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., & Іванюк, О. І. (20–21 лютого 2020 р.). *Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом на масу тіла оваріоектомованих щурів.* Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження), «Planta + Досягнення та перспективи». Київ, 231–232. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

12. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., & Іванюк, О. І. (22–23 жовтня 2019 р.). *Скринінгове дослідження нових вагінальних гелів з ресвератролом та*

гіалуроновою кислотою. Матеріали п’ятої науково-практичної конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських засобів: від розробки до застосування», присвяченої пам’яті Вікторова Олексія Павловича. Київ, 36–37. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

13. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., Савченко, Н. В., & Савосько, С. І. (25 листопада 2020 р.). *Морфологічна оцінка ефективності вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою при експериментальному гіпоестрогеновому стані.* Матеріали XIII Міжнародної науково-методичної інтернет-конференції «Сучасні концепції викладання природничих дисциплін у медичних освітніх закладах». Харків, 151–152. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

ANNOTATION

Stryga O. A. Pharmacological study of vaginal gel combined with resveratrol and hyaluronic acid. — Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, branch of knowledge 22 —Health care, on a specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy». Bogomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is a pharmacological study of a new vaginal gel of combined composition with resveratrol and hyaluronic acid, intended for the treatment of hypoestrogenic disorders, in particular, genitourinary disorders, which occur in women due to physiological (menopausal) or pathological (post-castration) levels. The dissertation presents a theoretical and experimental substantiation of the feasibility of developing a drug of local (topical) action, which included such active pharmaceutical ingredients as polyphenol resveratrol and hyaluronic acid. Phytoestrogen Resveratrol is analog of natural sex hormones, estrogen receptor

agonist. Hyaluronic acid is exogenic glucosamine glycan analog. It is part of vaginal mucus, physiological moisturizer, lubricant, and an important component of the protective barrier of the genital tract. Together with excipients (lactic acid, etc.), they form an original composition that still has no analogs in the Ukrainian pharmaceutical market.

With the onset of menopause in women, there are genetically programmed age-related changes associated with a gradual decline in ovarian function. Premature «exclusion» of the ovaries, which occurs after surgical or pharmacological castration, due to ovarian depletion syndrome after assisted reproductive technologies, leads to abrupt changes in the hormonal background in younger women. Different etiologies of menopausal disorders develop against the background of estrogen deficiency and can cause pathological symptoms — menopausal syndrome, which reduces the quality of life of women. Menopause is the cause of osteoporosis, cardiovascular complications, cognitive impairment, metabolic and metabolic disorders in women.

Hormone replacement therapy (menopausal hormone therapy, MHT) is currently the most effective treatment for menopausal syndrome. Nevertheless, there are still women who are contraindicated or stop taking hormonal drugs due to side effects. A significant proportion of women in Ukraine do not seek medical attention for MHT due to hormonal phobia or ignorance of MHT. The effectiveness and safety of MHT depend on the timely start of therapy when the «therapeutic window» is still open [2]. Therefore, most women should have alternative treatments for menopausal symptoms, including systemic and topical phytoestrogen therapy. There is a significant number of drugs and dietary supplements containing phytoestrogens in the oral dosage forms in Ukraine. On the other hand, there is a lack of topical drugs that complement systemic effects or eliminate mainly genitourinary manifestations (dryness, itching, irritation of the vaginal mucosa, dyspareunia, urinary incontinence, etc..) To sum up, significant demand for topical drugs is not offset by a limited range of drugs.

A promising way to solve the current scientific problem of modern pharmacology is the development of vaginal drugs with multimodal action with phytoestrogens, obtained using modern pharmaceutical technologies and show high pharmacological activity in hypoestrogenic conditions that can effectively and safely correct pathological manifestations, including genitourinary symptoms. There are almost no Ukrainian drugs of this action, and most of the available range is represented by foreign drugs [3].

Vaginal gels with resveratrol and hyaluronic acid were developed under the guidance of Doctor of Pharmacy, Professor Ruban O. A. at the Department of Industrial Technology of the National University of Pharmacy (Kharkov). The gels contain resveratrol (R), which is a polyphenol, a phytoestrogen that does not require prior metabolism to detect pharmacological action (unlike soy isoflavones), hyaluronic acid (HA), and excipients, including lactic acid (LA). Resveratrol substance containing 50 % trans-resveratrol of plant origin, obtained from *Polygonum Cuspidatum*. Two drugs were selected for comparison. The first drug was Ginodek gel, used in screening studies, has two common components (hyaluronan, lactic acid) with the studied gels and the same indications for use. The second comparison drug, Colpotrophin cream, was used in the in-depth pharmacological studies of the sample leader and is used for hormone replacement therapy, contains promestrin, a synthetic estrogen.

Performing the research part of the dissertation, a comprehensive approach was used with the involvement of pharmacological, toxicological, physiological, biochemical, histological, enzyme-linked immunosorbent assays, molecular genetic, and statistical research methods.

To substantiate the optimal composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid, screening studies were performed on four test samples of vaginal gels, which differed in the content of the main active ingredient resveratrol (0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %), all other ingredients remained in the same amount.

Screening studies were performed on a model of surgical castration of females of white nonlinear rats aged 3–6 months. Experimental test samples were administered 35 days after the formation of the pathology, in the treatment regimen, 1 ml of gel intravaginally, once a day for 28 days. Ginodek vaginal gel was chosen as a comparison drug. Intact animals (intact control group — IC), operated and untreated animals (controlled pathology group — CP) were selected as controls, they received isotonic sodium chloride solution, intravaginally in the same amount as test specimens. After the experiment, a macroscopic examination of the vaginal mucosa, lower genital tract, physical parameters (body weight dynamics, temperature at the root of the tail), pH of vaginal secretions, a microbial landscape of the vagina, histological examination of the vaginal mucosa.

According to the results of the screening study, it was found that the studied gels with R and HA were effective under intravaginal 28-day administration to ovariectomized female rats, as they restrained the increase in body weight caused by estrogen deficiency, normalized body temperature at the root of the tail («hot flushes»), helped to restore the vaginal microbiome and the acidic environment of vaginal secretions, prevented the development of atrophic changes in the vaginal mucosa. According to the results of the integrated evaluation of the therapeutic effect of vaginal gels, it was found that the optimal content of R in the dosage form is 0,5 %, because the vast majority of indicators in the model of experimental hypoestrogenic condition in animals, this concentration received the highest scores.

The data of the experimental study indicate the presence of not only local but also weak systemic action of the vaginal dosage form of the combined composition with R and HA, which necessitates the further in-depth study of the proposed composition. The results of this stage of the study became an experimental justification for the development and comprehensive study of vaginal gel with phytoestrogen R and HA as an alternative to hormone-containing drugs for the treatment of pathological hypoestrogenic conditions of various origins, especially menopausal genitourinary manifestations.

The next step was to study the safety profile of vaginal gel of combined composition with R and HA, in particular, the study of local tolerability, acute toxicity with a single intravaginal (i/v) and intragastric (i/g) administration, and chronic toxicity of the gel with multiple (90 days) i/v administration.

It was found that vaginal gel with R and HA does not cause local irritation under conditions of single and prolonged vaginal use. The results of the study of the acute toxicity of the gel with R and HA allow it to be classified as non-toxic substances, namely — V toxicity class (almost non-toxic substance) according to the classification of K. K. Sidorova [4]. Data on long-term i/vag administration indicate the absence of general toxic effects on animals and local irritation of the mucous membrane of the lower genital tract.

An in-depth pharmacological study of the pharmacodynamics of vaginal gel with R and HA was performed on two models that were as close as possible to the clinical conditions of hypoestrogenic conditions.

The pharmacological effect of the vaginal gel on local (genitourinary) and systemic manifestations of hypoestrogenism was studied on the model of bilateral ovariectomy (surgical castration).

It is shown that at 28-day administration, the therapeutic effect of the gel with R and HA was manifested by a slowing of the rate of weight gain of animals. In contrast to untreated females of the CP group, in which body weight gain was 23 %, in animals treated with vaginal gel after 4 weeks of treatment, body weight gain was not more than 5.96 %, and in animals treated with the comparison drug — cream with synthetic estrogen promethrin — 6.83 %. Evidence of the systemic therapeutic effect of the gel with R and HA was a significantly less pronounced symptom of fever at the root of the tail (this corresponds to the menopausal symptom of «hot flashes» in women). In animals of the CP group, compared with intact females, this figure increased by 10 %, while under the influence of treatment with phytoestrogen gel, it increased by only 1.0 %, and under the influence of the comparison drug — by 1.6 %. The effectiveness of the vaginal gel had a positive effect on the balance of sex

hormones, the level of estradiol was 1.5 times and progesterone 1.4 times higher than in untreated animals, the severity of the therapeutic effect of the gel was almost not inferior to the topical comparison drug promestryn.

It was found that under the influence of gel treatment with R and HA, the pathological manifestations of hypoestrogenism on the part of the vaginal mucosa were most clearly reduced. According to the total macroscopic manifestations, the gel with phytoestrogen reduced the signs of hypoestrogenic atrophy from 7 points, which was observed in animals of the CP group, to 2 points, not inferior to the effectiveness of the pharmacological activity of the cream with estrogen. This correlated with a significant positive effect of the vaginal gel on the structural and functional state of the vaginal mucosa, as evidenced by histological studies, in particular reflected in an increase in epithelial thickness, the appearance of signs of typical estrogen-like action, enhanced regenerative processes (pH 4.4–4.5).

Morphological examination of the heart muscle and skeletal system revealed a protective effect of vaginal gel with R and HA and its ability to inhibit the development of degenerative changes in the myocardium, articular cartilage, and subchondral trabecular bone, which occurred in untreated estrogen-deficient rats. In terms of the ability to eliminate genital manifestations of hypoestrogenism, cardio- and chondroprotective effects, the gel with R and HA did not differ from the action of the topical comparison drug promestrin.

The model of pharmacological castration of female rats investigated the possible mechanisms of neuroprotective action of the gel with R and HA and its effect on behavioral reactions that characterize the functional state of the CNS.

The expression of the main endogenous markers of neuroprotection: HIF-1α mRNA, HSP70 mRNA, and c-fos mRNA and the concentration of HSP70 in the cytoplasm and mitochondria in the CA1 hippocampal zone of female rats' brain was determined by real-time polymerase chain reaction. It was found that the expression of HIF-1α mRNA in the CP group was 92.2 % lower compared to the IC group. There was also a decrease in the expression of HSP70 mRNA by 92.5 % and c-fos

mRNA by 80.6 %. Enzyme-linked immunosorbent assay revealed a 61 % decrease in the concentration of HSP70 heat shock proteins in mitochondria and brain cytosol in animals in hypoestrogenic state.

In the treatment of animals with acquired hypoestrogenic sate due to pharmacological castration, vaginal gel with R and HA increased by 150 % the expression of HIF-1α mRNA HSP70 mRNA by 33 % and 200 % — c-fos mRNA in the CA1 hippocampal zone. But a more pronounced neuroprotective effect was achieved in combination therapy with a gel with R and HA together with intragastric administration of resveratrol at a dose of 100 mg/kg.

Topical action enhanced by systemic exposure to the phytoestrogen resveratrol resulted in significantly greater expression of HIF-1α mRNA, HSP70 mRNA, and c-fos mRNA in the CA1 hippocampus of animals with hypoestrogenic status 23 times, 30.7 times, and 6.7 times, respectively. Furthermore, the expression level of HIF-1α mRNA, HSP70 mRNA, and c-fos mRNA in the CA1 hippocampus of animals with the hypoestrogenic status became the same as in IC group or even more by 2.3 times (mRNA HSP70). The combined administration of vaginal gel and tablets with resveratrol to female rats in the hypoestrogenic state significantly increased the concentration of HSP70 in the cytosolic and mitochondrial fractions of the brain by 118 and 177 %%, respectively.

Course administration of the gel in the group with R and HA ovariectomized females contributes to the normalization of the functional state of the CNS: tentative research activity and reducing the manifestations of autonomic-emotional reactions, the indicators of which have reached the level of intact animals. Combination therapy with gel and tablets with resveratrol showed a large pronounced psychotropic effect, which was completely eliminated in animals showing depression, which was proposed due to estrogen deficiency. For a gradual effect on all studies of CNS indicators, the combined administration of gel and tablets with resveratrol significantly exceeded the monotherapy with gel with R and HA and active drugs compared with the synthetic estrogenic disease. Thus, new scientific

data have been obtained to substantiate the feasibility of developing an innovative topical drug with resveratrol and hyaluronic acid, to establish the optimal composition of the dosage form, to demonstrate the effectiveness of therapeutic action in various experimental models of hypoestrogenic conditions, and to elucidate certain mechanisms of its neuroprotective action.

The results of the pharmacological study of a new vaginal gel with phytoestrogen resveratrol and hyaluronic acid were introduced into the research work of related departments of higher education institutions of Ukraine.

Key words: resveratrol, hyaluronic acid, estrogen-like action, vaginal gel, hypoestrogenic condition, rats.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 23
ВСТУП 25
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ МЕНОПАУЗАЛЬНИХ РОЗЛАДІВ ТА ДЕФІЦИТУ ЕСТРОГЕНІВ (огляд літератури) 35
1.1 Ендокринні маркери старіння жіночої репродуктивної системи 35
1.2 Характеристика клімактеричного періоду 37
1.3 Фармакологічна корекція менопаузального синдрому гормональними лікарськими засобами 46
1.4 Ресвератрол та перспективи розробки на його основі нових лікарських засобів топікальної дії для лікування менопаузального синдрому 54
1.5 Використання гіалуронової кислоти як інноваційний підхід до корекції менопаузального генітоуринального синдрому 61
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 66
РОЗДІЛ 3 ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ НОВОГО ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ 81
3.1 Динаміка маси тіла та вегетативні реакції оваріоектомованих самок щурів під впливом лікування вагінальних гелів із ресвератролом та гіалуроновою кислотою 81
3.2 Зміни температури тіла біля кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 83
3.3 Вплив вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на мікробіоценоз та кислотність вагінального секрету оваріоектомованих самок щурів 86
3.4 Вплив вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

на pH вагінального секрету оваріоектомованих самок щурів 88
3.5 Зміни макро- та мікроскопічного стану генітального тракту оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 89
3.6 Вивчення гострої та хронічної токсичності вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 93
Висновки до розділу 3 98
РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ НА МОДЕЛІ БІЛАТЕРАЛЬНОЇ ОВАРІОЕКТОМІЇ У ЩУРІВ 100
4.1 Динаміка маси тіла та вегетативні реакції оваріоектомованих самок щурів під впливом лікування вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою 100
4.2 Зміни температури тіла біля кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою 102
4.3 Вплив вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на гормональний стан оваріоектомованих самок щурів 105
4.4 Зміни макро- та мікроскопічного стану генітального тракту оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 106
4.5 Морфологічний стан серцево-судинної системи оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 111
4.6 Морфологічний стан кісткової тканини оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою 113
Висновки до розділу 4 115

РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ МОНОТЕРАПІЇ ТА КОМБІНАЦІЇ ТОПІЧНОГО І СИСТЕМНОГО УВЕДЕННЯ РЕСВЕРАТРОЛУ НА ПОКАЗНИКИ ЕНДОГЕННОЇ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЦНС НА МОДЕЛІ ХІМІЧНОЇ КАСТРАЦІЇ У ЩУРІВ 117
5.1 Характер експресії маркерів ендогенної нейропротекції після курсового лікування гелем та таблетками з ревератролом 117
5.2 Вплив вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на функціональний стан центральної нервової системи оваріоектомованих самок щурів 121
Висновки до розділу 5 123
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 125
ВИСНОВКИ 136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 139
ДОДАТКИ 163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ — активний фармацевтичний інгредієнт

АФК — активні форми кисню

ГК — гіалуронова кислота

Гл-РГ — гонадоліберин

Е2 — естрадіол

Е3 — естріол

ЕД — ендотеліальна дисфункція

ЖСГ — жіночі статеві гормони

ІК — інтактний контроль

ІР — інсулінорезистентність

ІХС — ішемічна хвороба серця

КП — група тварин контролю на патологію (контрольна патологія)

КР — клімактеричні розлади

КС — клімактеричний синдром

КУО — колонієутворювальні одиниці життєздатних мікроорганізмів

ЛГ — лютеїнізуючий гормон

ЛПВЩ — ліпопротеїди високої щільності

ЛПНЩ — ліпопротеїди низької щільності

МГТ — менопаузальна гормональна терапія

МК — молочна кислота

ММІ — модифікований менопаузльний індекс

МР — менопаузальні розлади

мРНК — матрична рибонуклеїнова кислота

МС — менопаузальний синдром

ОЕ — оваріоектомія

П — проместрин

Р — ресвератрол

СОП — слизова оболонка піхви

ССЗ — серцево-судинні захворювання

ССС — серцево-судинна система

Т3 — трийодтиронін

Т4 — тироксин

ТТГ — тиреотропний гормон

ФСГ — фолікулостимулювальний гормон

ХЛ — холестерин

цАМФ — циклічний аденозинмонофосфат

eNOS — ендотеліальна синтаза оксиду азоту

c-fos — білок, який кодується однойменним геном

ER — естрогеновий рецептор

GPR30 — G-білок 30

HIF-1 — фактор, індукований гіпоксією

HSP70 — білок теплового шоку

NO — оксид нітрогену

VSD — 4-vinylcyclohexene diepoxide; 4-вінілциклогексен діепоксид

ВСТУП

Одна з найбільш актуальних проблем сучасної медицини пов'язана зі старінням населення та зростанням вікової групи людей старших за 65 років. З кожним роком прогресивно збільшується і частка жінок старшої вікової групи. За статистичними даними, натепер понад 10 % усієї жіночої популяції складають пані в клімактеричному періоді, а до 2030 року більше 1 млрд. 200 млн. жінок на землі будуть у стані менопаузи [5]. Пенсійний вік для жінок збільшується практично в усіх країнах, проте посилюється роль сучасної жінки у суспільному житті, родині, вихованні дітей та онуків. Отже, збереження працездатності, якості та тривалості життя жінок є не тільки важливою медичною, а й соціально-економічною проблемою сьогодення. Не випадково у 2014 році Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) новим пріоритетом у роботі національних систем охорони здоров'я визначила здорове старіння [6].

У період менопаузи відбувається згасання функцій органів і систем через зниження синтезу і секреції статевих стероїдних гормонів — естрогенів [7–9]. Менопауза у жінок є абсолютно фізіологічним станом. У цей період тільки 20 % жінок не відчувають проблем [5], а більш ніж у 50 % жінок при зниженні продукування естрогенів викликають різні патологічні симптоми [10]. Але за фізіологічних умов зниження рівня статевих гормонів проходить повільно, тому більша частина жінок встигають адаптуватися до таких змін. Значно гірше перебігає індукований клімакс. Жінки з дефіцитом статевих гормонів, що виникають внаслідок радіаційної терапії, передчасною недостатністю яєчників до 40 років (приблизно 10 %) після допоміжних репродуктивних технологій, хірургічних втручань на статевих органах, медикаментозної гіпоестрогенії, що виникає при фармакологічній кастрації після лікування онкологічних захворювань, приєднуються до групи жінок з кліматеричними розладами. Клінічні прояви, що відбуваються внаслідок зниження синтезу естрогенів, є

різноманітними. Їх можна поділити за часом: до ранніх належать вазомоторні, психоемоційні; до середніх — генітоуринарні розлади, сексуальна дисфункція, атрофічні зміни шкіри, слизових оболонок піхви, нігтів, волосся; до пізніх клінічних проявів, які супроводжуються драматичними наслідками, належать — менопаузальний метаболічний синдром, що зумовлений атеросклерозом, артеріальною гіпертензією, остеопорозом та неврологічними симптомами — зниженням когнітивних функцій, пам'яті, хворобою Альцгеймера [11].

Актуальною проблемою сучасної гінекології є попередження та усунення специфічних симптомів, які виникають у жінок у період менопаузи. Сучасні клінічні рекомендації щодо лікування менопаузальних розладів спрямовані в основному на замісну терапію естрогенами або естрогенами у комбінації з гестагенами. Натепер замісна гормональна терапія (ЗГТ) — застаріла назва, нині менопаузальна гормональна терапія (МГТ) є найбільш ефективним підходом для усунення більшості системних проявів дефіциту естрогенів різної етіології та належить до «золотого стандарту». Зазвичай препарати для МГТ випускають у пероральних та дермальних лікарських формах. Однак такий підхід має низку недоліків у плані системних побічних ефектів. Враховуючи, що найбільш дискомфортними симтомами в період менопаузи є генітоуринальні розлади, доцільно використовувати альтернативну групу негормональних засобів, зокрема препарати зволожувальної дії, лубриканти, репаранти, коректори вагінального мікробіому тощо. Оптимальними для фармакологічної корекції менопаузальних генітоуринарних розладів вважають вагінальні лікарські форми, виготовлені на гелевій основі. Ефективними та водночас більш безпечними, щодо розвитку побічних реакцій є рослинні екстракти, що містять фітоестрогени.

Препарати МГТ значною мірою покращують життя та зберігають здоров'я жінок старшої вікової групи, які близько третини життя проживають із дефіцитом жіночих статевих гормонів. Призначення МГТ в Україні регламентоване Національним консенсусом щодо ведення пацієнток у

клімактерії. Однак тривала гормональна терапія асоціюється з розвитком серйозних побічних ефектів, серед яких підвищення ризику виникнення ССЗ, зокрема ішемічної хвороби серця, інсультів, інфарктів, тромбозів, а також пухлин молочної залози. Слід враховувати більшу ефективність МГТ на ранніх термінах природної менопаузи, під час відкритого «терапевтичного вікна», після закінчення якого призначення ЗГТ у багато разів підвищує вірогідність розвитку небажаних ускладнень. Абсолютними протипоказами до МГТ є маткові кровотечі невизначеної етіології, пухлини, тромбоемболічні ускладнення в анамнезі, гострі захворювання печінки. Існує також проблема негативного відношення жінок до гормональних лікарських засобів, так звана «гормонофобія», наявність відносних протипоказань. У країнах Європи частота призначення МГТ становить у середньому 30–40 %, а в Україні цей показник не перевищує 1 % [12]. Альтернативними методами терапії генітоуринальних проявів клімактеричного синдрому є застосування препаратів із фітоестрогенами, проте їх асортимент вкрай обмежений, частка вагінальних гелей не перевищує 5 %, а на фармацевтичному ринку України лише 6 % препаратів вітизняних виробників, а 94 % — це продукти імпортного виробництва [3].

Підставою для проведення досліджень стали вищенаведенні дані для вивчення нових вагінальних гелей комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою для корекції гіпоестрогенових станів.

Мета і завдання дослідження

Мета дослідження — експериментальне обґрунтування розробки та фармакологічне вивчення нового вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Провести скринінгові дослідження тест-зразків із різними концентраціями ресвератролу для визначення оптимального складу вагінального гелю комбінованого складу.

2. Вивчити гостру та хронічну токсичність вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою при інтравагінальному та внутрішньошлунковому шляхах уведення.

3. Оцінити лікувальну дію вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на моделі білатеральної оваріоектомії у щурів та порівняти його ефективність із референтними препаратами.

4. Провести морфологічну оцінку лікувального впливу вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на мікроскопічний стан слизової оболонки генітального тракту, серцево-судинної та кісткової систем на моделі білатеральної оваріоектомії у щурів.

5. Дослідити вплив вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на показники ендогенної нейропротекції за умов монотерапії та у комбінації з таблетками ресвератролу на моделі хімічної кастрації у щурів.

Об'єкт дослідження — гіпоестрогенові стани різного ґенезу в експерименті.

Предмет дослідження — фармакологічні властивості вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою.

Методи дослідження

При виконанні дисертаційної роботи використовувався комплексний методичний підхід із залученням фармакологічних (моделювання гіпоестрогенового стану шляхом хірургічної кастрації (білатеральна оваріоектомія за методом Я. Д. Кіршенблата), фармакологічної кастрації (уведення 4-вінілциклогексен діепоксиду), фізичні методи (вимірювання маси, температури тіла, pH вагінального секрету як показників ефективності

лікування), мікробіологічний (дослідженні вагінального біоценозу, визначення кількості колонієутворювальних одиниць мікроорганізмів), біохімічних (визначення вмісту статевих гормонів у сироватці крові, рівня HSP70 у цитоплазмі і мітохондріях у CA1 зоні гіпокампу головного мозку), гістологічних (дослідження мікроскопічної структури слизової оболонки піхви, серця, хрящової і кісткової тканин, оцінка морфометрічних показників), токсикологічних (вивчення параметрів безпеки шляхом визначення гострої та хронічної токсичності в/ш та і/ваг уведення), фізіологічний метод (спостереження за функціональним станом ЦНС, оцінювання рухової, дослідницької активності тварин), молекулярно-генетичний метод полімеразної ланцюгової реакції (визначення характеру експресії основних ендогенних маркерів нейропротекції: мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos у тканинах головного мозку) і статистичних методів дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано відповідно до плану науково-дослідної роботи Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України у межах теми «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою» (№ державної реєстрації 0120U101410, 2017–2021 рр.). Дисертант є виконавцем зазначеної теми.

Наукова новизна одержаних результатів

У роботі вперше проведено дослідження фармакологічних властивостей і можливих механізмів дії інноваційного лікарського засобу комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою у формі вагінального гелю. Базуючись на результатах теоретичного та експериментального скринінгового вивчення первинної фармакодинаміки, запропоновано оптимальний склад лікарської форми за вмістом активної діючої речовини ресвератролу. Доведено, що тест-зразок лідер, який містить 0,5 % ресвератролу, гіалуронову та молочну

кислоти, виявляє виражену естрогеноподібну активність, не тільки топічну, але й можливу системну дію, не чинить негативної місцевоподразнювальної дії, не виявляє загальнотоксичних властивостей, не викликає негативної дії на органи-мішені (яєчники, піхву) за умов одноразового (інтравагінального і внутрішньошлункового) та багаторазового інтравагінального 90-денного введення. За своєю ефективністю гель із ресвератролом і гіалуроновою кислотою перевершує дію препарату порівняння вагінальний гель «Гінодек».

Отримано нові експериментальні дані на різних моделях гіпоестрогенії (хірургічної і фармакологічної кастрації) щодо здатності гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою ефективно усувати не тільки локальні гіпоестрогенові прояви з боку генітального тракту (відновлювати структуру та функціональну активність слизової оболонки піхви, вагінальний мікробіом), але й виявляти резорбтивні ефекти, а саме: підвищувати рівень естрадіолу і прогестерону у сироватці крові щурів, усувати вазомоторні порушення, покращувати рухову і дослідницьку активність тварин, стримувати розвиток патологічних проявів у серці, хрящовій і кістковій тканинах, що розвиваються внаслідок дефіциту естрогенів. За своєю ефективністю вагінальний гель із фітоестрогеном не поступається дії крему з синтетичним естрогеном проместрином.

Поглиблено існуючі наукові уявлення щодо захисної дії ресвератролу на нейрони гіпокампу при естрогендефіцитному стані, що полягає у його здатності активувати HSP70 — залежні механізми ендогенної нейропротекції, а саме підвищувати експресію мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 та мРНК c-fos у головному мозку самок щурів. Доведено, що реалізація наведеного механізму нейропротекції можлива лише при комбінованому використанні вагінального гелю і пероральної лікарської форми ресвератролу дозою 100 мг/кг, що забезпечує більшу біодоступність фітоестрогену до ЦНС.

Отримані результати є науковим обґрунтуванням оптимізації лікування гіпоестрогенових проявів (перш за все генітоуринальних) різного ґенезу, а

також доцільності посилення органопротективних ефектів вагінального гелю системною фармакологічною дією ресвератролу.

Практичне значення одержаних результатів

Експериментально обґрунтовано доцільність розробки нового фітоестрогенвмісного засобу топічної дії, до складу якого входять ресвератрол і гіалуронова кислота, що може бути рекомендовано для профілактики і лікування ранніх проявів естрогендефіцитних станів. На підставі проведених експериментальних досліджень запропонована нова фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального (пат. 139105 України; № u 2019 05153; заявл. від 15.05.2019; опубл. 26.12.2019, Бюл. № 24).

Матеріали дисертаційної роботи можуть бути використані при підготовці модулю 4 «Звіти про доклінічні дслідження» реєстраційного досьє лікарського засобу, проєкту інструкції до медичного застування та програми дореєстраційного клінічного дослідження вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою.

Результати роботи впроваджено в науково-педагогічний процес профільних кафедр медичних і фармацевтичного ЗВО: фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (протокол № 4 від 02.04.2021 р.); фармакології і клінічної фармакології Дніпровського державного медичного університету МОЗ України (протокол № 9 від 26.03.2021 р.); фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету МОЗ України (протокол № 5 від 07.04.2021 р.); фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету МОЗ України (протокол № 18 від 28.04.2021 р.); кафедри фармакології, клінічної фармакології, патологічної фізіології ПВНЗ «Київський медичний університет» (акт впровадження від 22.10.2020 р.).

Особистий внесок здобувача

Дисертація є самостійною завершеною науковою роботою. Разом із науковим керівником визначена мета і поставлені завдання дослідження, обрані методичні підходи до фармакологічного вивчення вагінальних гелів, розроблена програма експериментальних досліджень. Дисертантом самостійно здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації; проведено експериментальні дослідження; опрацьовано статистичні дані; здійснено патентно-інформаційний пошук; проведено аналіз та узагальнення результатів; сформульовано висновки.

Виконання гістологічних досліджень здійснювалося за консультативної допомоги доц. кафедри гістології НМУ імені О. О. Богомольця к. мед. н. Савосько С. І., молекулярно-генетичні дослідження механізмів нейропротекторної дії проведені на базі наукової лабораторії кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України за консультативної допомоги д. біол. н., проф. Бєленічева І. Ф.

Співавторами статей є науковий керівник д. мед. н., проф. Зайченко Г. В. та фахівці, які брали участь у виконанні окремих фрагментів досліджень: О. І. Іванюк, О. А. Рубан, Н. О. Горчакова, І. Ф. Беленічев, С. І. Савосько, К. Ю. Сорокопуд. Особистий внесок конкретизовано у переліку праць, опублікованих за темою дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації

Основні положення десертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: V національному з'їзді фармакологів України (м. Запоріжжя, 18–20 жовтня 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження) «Planta + Досягнення та перспективи» (м. Київ, 20–21 лютого 2020 р.); п'ятій науково-практичній конференції «Безпека та нормативно-правовий супровід лікарських

засобів: від розробки до застосування», присвяченій пам'яті Вікторова Олексія Павловича (м. Київ, 22–23 жовтня 2019 р.); XIII Міжнародній науково-методичній інтернет-конференції «Сучасні концепції викладання природничих дисциплін у медичних освітніх закладах» (м. Харків, 25 листопада 2020 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць: 8 статтей (6 — у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 1 — у виданні, що індексується у наукометричній базі Scopus, 1 — у виданні країни ЕС); 1 патент України на корисну модель, 4 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 183 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатка. Обсяг основного тексту дисертації складає 138 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 22 таблицями, 12 рисунками, 4 додатками (A, B, C, D), 1 патент, 5 актами впровадження. Список використаних джерел містить 212 найменувань, з них 105 кирилицею та 107 латиницею.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ МЕНОПАУЗАЛЬНИХ РОЗЛАДІВ ТА ДЕФІЦИТУ ЕСТРОГЕНІВ

(огляд літератури)

1.1 Ендокринні маркери старіння жіночої репродуктивної системи

Демографічна ситуація в Україні в останнє двадцятиріччя повною мірою відзеркалює світові тенденції та характеризується старінням населення, зростанням чисельності людей похилого віку. У гендерному розрізі це виглядає збільшенням частки жінок старшої вікової групи. Це пов'язано зі збільшенням тривалості життя та раннім настанням менопаузи. За даними статистики, 46,7 % жіночого населення в нашій країні — це пані старші за 50 років (менопаузальний період), тоді як лише 28 % — у репродуктивному віці 18–49 років [13, 14].

Клімактерій — це природний процес фізіологічного старіння, протягом якого в репродуктивній системі переважають інволютивні процеси. Порушення адаптаційних процесів до поступового виключення яєчників у цей час призводить до розвитку у 35–80 % жінок клімактеричного синдрому. Останній супроводжується цілою низкою симптомів нервово-психічного, вегетосудинного та обмінотрофічного характеру. Важливо зазначити, що з підвищенням пенсійного віку до 60 років питання збереження якості життя та працездатності жінки в цей період набуває не тільки медичного, але й важливого соціально-економічного значення [15].

Центральною патофізіологічною ендокринною подією в організмі жінки, що знаменує початок порушень менструальної функції, є гормональні зміни, зокрема падіння вмісту інгібіну В у фолікулярну фазу з незначним підйомом рівня фолікулостимулювального гормону (ФСГ) і незмінним рівнем естріолу та інгібіну А. Приблизно за два роки до останньої менструації рівень естрогенів

падає, а ФСГ зростає. Прогресування менопаузального переходу супроводжується виснаженням фолікулів, яєчники стають менш чутливими до стимуляції гонадотропіном і виникає стан відносної гіпоестрогенії. На думку більшості дослідників, маркерами старіння репродуктивної системи виступають хронологічний вік, рівеь антимюллєрового гормону (АМГ), ФСГ та інгібін В у ранню фолікулярну фазу, об'єм яєчників та число антральних фолікулів [16]. Існують дані, що інсуліноподібний фактор росту І може виступати ще одним маркером оваріального резерву та розвитку менопаузи [17]. Показник вагінального середовища pH також може використовуватися для оцінки менопаузального стану жінки, оскільки він відображає естрогенну насиченість організму [18].

Основною причиною розвитку клімактеричних розладів вважається вікове зниження синтезу естрогенів у яєчниках. Основним і найбільш активним жіночим статевим гормоном-естрогеном є естрадіол (Е2). Він відіграє головну роль в організмі жінки від пубертату до менопаузи. З віком його вміст знижується, а у постклімактеричному періоді рівень Е2 у сироватці крові значно менший, ніж чутливість більшості сучасних методів детекції гормону.

Естрадіол відповідає в організмі за більш ніж 400 функцій, впливаючи на органи-мішені — матку, піхву, молочні залози. Цей статевий гормон визначає психоемоційні особливості жінки, впливає на формування деяких ділянок мозку, статеву поведінку. Естроген посилює дію збудливих нейромедіаторів, інгібує моноамінооксидазу в мозку, модулює нейротрансмітерні системи ацетилхоліну, серотоніну, норадреналіну та глутамату, що залучені до процесів формування пам'яті, здатності до навчання, настрою, стрес-резистентності тощо., збільшує вміст оксиду азоту (NO) у нейронах. Крім того, Е2 впливає на функцію надниркових і щитоподібної залоз, епіфізу, регулює приймання їжі, витрати енергії, функцію жирової тканини.

Менш активним за Е2 вважається естрон. До настання менопаузи він також утворюється в яєчниках, надниркових залозах, печінці, жировій тканині

та є субстратом для 17-гідроксистероїддегідрогенази у процесі ендогенного синтезу Е2. Пізніше естрон стає основним естрогеном крові, утворюючись переважно у білій жировій тканині з андростендіону. Найменш активний естроген — естріол (Е3), він синтезується головним чином в яєчниках та плаценті під час вагітності [19].

Естрогени впливають на клітини шляхом взаємодії з внутрішньоклітинним ядерним рецептором ER, причому комплекс «естроген–рецептор» існує впродовж різного часу: від 1–4 год для менш активного Е3, до 6–20 год для Е2 [20]. Естрогенові рецептори (ER) виявляються не тільки в клітинах органів-мішеней (матка, молочні залози, нижня третина сечоводів, детрузор, судинні сплетення уретри, м'язи та епітелій піхви, судини та м'язи тазового дна, зв'язковий апарат малого таза), де вони широко представлені. Вони широко представлені у мозку, серці, артеріях, кістковій тканині, шкірі, слизовій оболонці рота, гортані, очей та ін. [21, 22]. Виділяють два типи ER: альфа (ERα) і бета (ERβ). Як показали S. Green та співавт. (1996 р.), обидві форми зв'язування Е2 із рецептором приводять до конформаційних змін, його димеризації, прив'язування до специфічного сайту ДНК у ділянці промоутера гена та подальшої модуляції транскрипції генів. ERα та ERβ мають аналогічні домени зв'язування з ДНК (96 % гомологія) та домени зв'язування з лігандом (56 % гомологія) [23].

Описані швидкі, негеномні ефекти естрогенів з латентним періодом до кількох секунд, що виникають у матці (шляхом акумуляції цАМФ), у нейронах головного мозку (зміна електричної активності або модуляція іонних каналів). Естрогени здатні активувати цитоплазматичні сигнальні шляхи, зокрема Src/Shc/ERK, а також взаємодіяти з такими факторами росту, як інсуліноподібний фактор росту-1 (ІПФР-1) і трансформуючими факторами росту, беручи участь у процесах апоптозу й посилюючи синтез колагену. Відповідь клітин на дію естрогенів визначається не тільки кількістю гормону, а й рівнем експресії двох основних ізоформ ER, що може відрізнятися в різних

частинах тіла, мозку, шкіри тощо, а також зв’язуванням із корегуляторними білками, яких на сьогодні вже відкрито близько двадцяти [24].

1.2 Характеристика клімактеричного періоду

Клімактеричний період характеризується віковими змінами: деяким зменшенням кількості клітин у різних органах, що призводить до порушень їхньої функції, та старінням репродуктивної функції з прогресуючою гіпоестрогенією. Значна участь естрогенів у регуляції фізіологічних функцій організму пояснює величезні зміни, які відбуваються у організмі жінки під час згасання репродуктивної функції. Поступово зменшуються темпи продукції естрогенів і прогестерону, що дає гормональні зсуви з відносним переважанням рівня андрогенів внаслідок продукування андростендіону та тестостерону в надниркових залозах. Починає превалювати естрон (він починає діяти у клітинах після перетворення в Е2), чому сприяє позагонадний синтез естрону в жировій тканині, його утворення з Е2, якого синтезується все менше в перименопаузі та у постменопаузальний період. Зі зменшенням продукування естрогенів та інгібіну за принципом зворотного зв’язку, у крові більш ніж у 10 разів зростає вміст ФСГ та у 3 рази — ЛГ. У щитоподібній залозі зменшується синтез кальцитоніну, що гальмує резорбцію кісткової тканини і втрату фосфату та кальцію (це сприяє розвитку остеопорозу). На фоні незмінної концентрації Т4 у крові визначається підвищений вміст Т3 [20]. Надниркові залози починають продукувати більше альдостерону і кортизолу. Зменшення витрат холестерину (ХЛ), як попередника для синтезу статевих гормонів, визначає зростання його вмісту у складі ЛПНЩ, що є передумовою розвитку ендотеліальної дисфункції (ЕД), атерогенезу і розвитку патологічних змін у серцево-судинній системі.

При фізіологічному перебігу менопаузи в організмі відбуваються специфічні зміни, які кваліфікують як естрогензалежні та розподіляють за часом виникнення. До ранніх симтомів відносять вазомоторні (припливи жару,

підвищена пітливість, зміни артеріального тиску, тахікардія, головний біль) або емоційно-психічні симптоми (когнітивні, слабкість, дратівливість, тривожність, депресія, зниження лібідо). До середньочасових — генітоуринальні розлади (сухість піхви, диспареунія, свербіж, мікротріщини на статевих губах, печіння, цисталгія, нетримання сечі), зміни шкіри та її придатків (сухість шкіри, зморшки, сухість і випадіння волосся, ламкість нігтів). До пізніх симтомів відносять метаболічні зміни у кістковій системі (остеопороз, біль у суглобах та хребті), серцево-судинні захворювання.

Естрогени в нервовій системі модулюють синтез, секрецію і метаболізм нейротрансмітерів, тропних гормонів, змінюючи біоелектричну активність мозку, забезпечуючи певні морфологічні характеристики та взаємодію гліальних клітин і нейронів, що позначається на функціональних властивостях нейронів та синапсів. Вікові зміни гіпоталамусу, який щільно взаємодіє з лімбічними структурами та ретикулярною формацією, пояснюють виникнення в період клімактерію у жінок емоційно-психічних розладів, зниження працездатності, погіршення когнітивних функцій (пам’яті і здатності до навчання), появу дратівливості, емоційної лабільності, які посідають значне місце у симптоматиці кліматеричного періоду та знижують якість життя [26]. Найчастіше вони спостерігаються у перименопаузі, тоді як у перші 5 років після менопаузи нейровегетативні та метаболічні зміни виявлені у 46,6 % жінок [27]. Такі нейровегетативні ускладнення, як приливи жару, нічна пітливість, порушення сну, відчувають до 80 % жінок, а частота та інтенсивність припливів індивідуальні — від легких та одиничних до багаторазових і виснажливих. Вважають, що механізм появи припливів полягає в тому, що внаслідок пароксизмального спазму капілярів розвивається венозний застій і центральна гіпертермія, а через 30–50 хв виникає характерне відчуття жару [26]. Існує думка, що такий варіант вазомоторних порушень є проявом гіпоталамічної дисфункції — значного підвищення секреції гонадоліберину (Гт-РГ), коливання вмісту норадреналіну, дофаміну,

ендогенних опіоїдів [28]. Дослідження останніх років свідчать про те, що припливи — це не тільки неприємні зовнішні прояви, цей симптом пов'язаний з порушенням кровопостачання життєво важливих органів. Показано, що в момент припливів жару у 76 % жінок виникає різке зниження мозкового кровообігу [29].

В умовах гіпоестрогенного стану атрофічні зміни у жінок проявляються у вигляді симптомів порушення функцій сечовивідного тракту та слизової оболонки піхви, в яких представлена значна кількість ERα та ERβ [30].

У 2014 р. експерти Міжнародного товариства з вивчення жіночого сексуального здоров'я та Північно-американського товариства з менопаузи офіційно схвалили та запропонували використовувати в клінічній практиці замість терміна «вульвовагінальна атрофія» новий — генітоуринарний синдром. Клімактеричні прояви виникають у 10 % жінок у перименопаузі, у 55–60 років їх частота досягає 50 %, а після 75 років практично всі жінки страждають від тих чи інших генітоуринальних розладів. Атрофічні та дистрофічні процеси у піхві проявляються симптомами сухості, свербежу, диспареунією, вагінальними виділеннями, у тому числі контактними, опущенням стінок піхви. Їх появу пов'язують зі зниженням кровообігу у піхві, гальмуванням проліферації епітелію, зменшенням функціональної активності епітеліоцитів, зокрема секретоутворення на фоні гіпоестрогенії [31].

Зазнає змін й слизова оболонка сечового міхура, у ній виникають атрофія, апоптоз гладком'язових волокон, зміни іннервації. Частково це пояснюється зменшенням рівня фактора росту нервової тканини, нейрокінів, цитокінів у детрузорі, зниженням м'язового тонусу уретри та розвитком вторинної інфекції, що стає підґрунтям дізурії (болісного, частого і мимовільного сечовипускання). Це спричиняє активацію синтезу нейроактивних субстанцій у субуретральному просторі сечового міхура, порушуються процеси синаптичної передачі, посилюється скоротливість

м’язового шару уретри [32]. Такі зміни визначаються як гіперактивний сечовий міхур.

В умовах гіпоестрогенного стану гальмується проліферація уротелію та виникає хронічне запалення сечовивідних шляхів. При цьому значно посилюється ризик розвитку інфекцій цих шляхів внаслідок порушення функціонування захисного механізму уретри — десквамації клітин її поверхневого шару, на яких відбувається адгезія патогенних мікроорганізмів. У постменопаузальному періоді 10–15 % жінок потерпають від рецидивів інфекцій сечовивідних шляхів [33], а у 20 % жінок виявляється безсимптомна бактеріурія [34] внаслідок порушення мікробіому піхви.

Мажорними представниками вагінального біотому є лактобацили (палички Додерлейна). Кількість вагінальних лактобактерій та pH піхви змінюються протягом життя жінки. Для лактобацил глікоген є найважливішим джерелом енергії, і вони здатні метаболізувати його з утворенням молочної кислоти та іонів водню. Це є фактором зниження pH вагінального середовища та стримує зростання патогенних мікроорганізмів [35]. Зменшення кислотності відбувається в пубертаті на фоні зростання вмісту естрогенів у крові та накопичення глікогену в епітеліальних клітинах піхви, яка колонізується цими бактеріями. Лактобактерії домінують упродовж усього репродуктивного періоду жінки [36], у постменопаузальному періоді на фоні редукції синтезу естрогенів та функціональної активності поверхневого вагінального епітелію знижується вміст глікогену, драматично зменшується кількість факультативних лактобактерій та зростає частка анаеробних лактобацил, які продукують меншу кількість перекису водню, що чинить пряму токсичну дію на патогенну мікрофлору. При збільшенні вмісту облігатно-анаеробних мікроорганізмів розвивається вагінальний дисбіоз, pH зростає до 6,0–7,0. Це створює умови до зростання кількості умовно-патогенних мікроорганізмів, таких як *Gardnerella vaginalis* та *Mobiluncus*, при pH 6,0 з’являються

Clostridium sordellii, при pH 6,5 — *Enterobacteriaceae*, при pH 7,0 — *Peptostreptococcus*. Так виникає бактеріальний вагіноз [37].

У жінок із генітоуринарними розладами в перименопаузі переважно визначається нормоценоз (59,8 %) та неспецифічні інфекції (неспецифічний вагініт у 22 % та бактеріальний вагіноз у 6,5 % пацієнток), тоді як у постменопаузі нормоценоз виявлявся у 44 % жінок, у 42 % — атрофічний вагініт, у 12 % — бактеріальний вагіноз, а у 2 % — неспецифічний вагініт. Вважають, що сукупність зниженого титру лактобацил та присутність парабазальних клітин є ознакою процесу атрофії слизової оболонки піхви внаслідок гіпоестрогенії, що прогресує (редукція судинної сітки у піхві, посилена гіпоксія тканин, що призводить до утворення виразок, атрофії тіла та шийки матки) [38].

У перші п’ять років постменопаузи суттєвих змін зазнає шкіра. Внаслідок деградації та структурних змін колагену й еластину зменшується її товщина, втрачається еластичність, утворюються зморшки. Зниження васкуляризації, змешення синтезу глікозаміногліканів впливає на здатність шкіри утримувати вологу, зменшується секреція шкірного сала, що суб’єктивно відчувається як сухість. Естрогенові рецептори присутні в клітинах дерми, кератиноцитах, сальних залозах, волосяних фолікулах, а різні ділянки шкіри відрізняються за видом та їх кількістю [39]. Під впливом Е2 в епідермісі посилюється проліферація та пригнічується апоптоз кератиноцитів [40], саме вони разом із фібробластами підтримують вміст колагену, запобігають втраті вологи і сприяють її збереженню у шкірі. У постменопаузі вміст андрогенів, що стимулюють продукування шкірного сала [39], зменшується повільніше, ніж естрогенів. З огляду на це саме відносною гіперандрогенією пояснюють жирність шкіри, акне, гірсутизм та алопеція, тому замісна гормональна терапія естрогенами у таких випадках неефективна. Для жінок у постменопаузальному періоді характерна так звана фронтальна фіброзна алопеція, зміни якості та кількості волосся [22].

Дефіцит естрогенів у жінок у період клімактерію супроводжується низкою порушень обміну речовин і розвитком серцево-судинної патології. З кожним роком після менопаузи зростає ймовірність порушення толерантності до глюкози. Розвитку інсулінорезистентності (ІР) сприяє підвищення концентрації базального інсуліну (майже у 90 % жінок у постменопаузі), а за розрахунками індексу HOMA (інсулін ≥ 25 мЕД/мл, індекс HOMA > 2,77) ІР діагностується майже у 40 % жінок. Ще одна причина ІР полягає у посиленні продукування адипоцитами лептину та прозапального цитокіну фактора некрозу пухлин альфа (ФНП-α), які порушують рецепцію інсуліну тканинами. Дефіцит естрогенів викликає проатерогенні зміни ліпідного спектра — підвищення вмісту загального ХЛ, ХЛ ЛПНЩ і зниження в середньому на 25 % кількості ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) [28, 41], що вважають біохімічними маркерами ендотеліальної дисфункції, ішемічної хвороби серця та інсульту.

Отже, атерогенну метаболічну тріаду становлять гіперінсулінемія, підвищення аполіпопротеїну В і колонії дрібних часточок ЛПНЩ, а окружність талії >90 см і накопичення тригліцеридів >2,3 ммоль/л є показниками цієї тріади. Гіперінсулінемія стимулює розростання гладком'язових клітин судин і фібробластів, тим самим сприяючи гіпертрофії стінок артерій та ремоделюванню міокарда, активізує симпато-адреналову систему, що призводить до вазоконстрикції і збільшення серцевого викиду. Відбувається збільшення синтезу холестерину, тригліцеридів, ЛПНЩ у печінці, що ушкоджує інтиму артерій [42].

Оскільки естрогени залучені до регуляції функції адипоцитів багатьма шляхами [43], абсолютний дефіцит ЖСГ частково відповідає за зниження інтенсивності метаболічних процесів, пов'язаних із витратами енергії. Збільшення кількості адипоцитів провокує зростання концентрації прозапального цитокіну інтерлейкіну-6 (ІЛ6) у крові, що знижує рецепцію інсуліну печінкою, збільшує вміст С-реактивного білка. Адипоцити

вісцеральної жирової тканини менш чутливі до інсуліну, що сприяє інтенсивному ліполізу з вивільненням значної кількості вільних жирних кислот. У 70–80 % жінок у постменопаузі діагностують ожиріння — ключову ланку виникнення метаболічного синдрому та а у подальшому цукрового діабету 2 типу [44]. Розподіл жирової тканини в постменопаузі пояснюється відносною гіперандрогенією, у більш ніж 80 % випадків формується абдомінальна форма ожиріння. Доведено, що жирова тканина експресує обидва види ER, причому ERβ — лише у бурій жировій тканині [45].

Підґрунтям розвитку серцево-судинних ускладнень на фоні гіпоестрогенії при старінні є певні естрогензалежні зміни у судинах, кардіоміоцитах, системі гемостазу тощо. Метаболічні зміни у жінок із гіпоестрогенією різного генезу провокують розвиток патології серцево-судинної системи, яка є причиною смерті у 43–49 % випадків [46].

Патогенез серцево-сосудинних захворювань у період менопаузи пов’язаний з активацією ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, що виникє внаслідок дефіциту естрогенів, це призводить до викиду судинозвужувального пептиду ендотеліну. Тому у половини жінок виникає підвищення артеріального тиску, а обтяження гіпертонічної хвороби — у 57 %. Морфологічним підгрунтям цього процесу є потовщення intima media, проліферація ендотеліоцитів, зменшення еластичності, зміни у гладеньких м’язах судин, розвиток ендотеліальної дисфункції [46, 47, 48].

Внесок гіпоестрогенії у розвиток ішемічної хвороби серця та таких макросудинних катастроф, як інфаркт міокарда та інсульт становить 25–43 % [49]. Естрогени підвищують активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [50]. Вважають, що механізм зменшення вазодилатації судин при старінні полягає у зменшенні активації та експресії eNOS і кількості рецепторів NO, інтенсифікації апоптозу ендотеліоцитів та генерації активних форм кисню (АФК), а також в ослабленні антипроліферативної дії Е2, якого стає менше [45, 47]. Припускають, що наявність ERб у судинному ендотелії вказує на

можливий механізм антиатеросклеротичної дії естрогенів [51], тоді як ERв може бути негативним регулятором ERб [52]. На це, ймовірно, вказує експресія ERв у ділянках коронарної кальцифікації та бляшок у хворих, що може бути пов'язано з розвитком захворювань коронарних артерій [53]. Утім, наявність ERб та ERв на коронарних судинах у жінок без ознак атеросклерозу відкриває можливості для спрямованої терапії кардіоваскулярних розладів. Статеві гормони модулюють й інші ендотеліальні фактори з вазодилатаційним ефектом, особливо у малих судинах. Так, ендотеліальний гіперполяризуючий фактор сприяє розслабленню гладенької мускулатури судин шляхом активації іонних каналів [54] і може діяти синергічно з NO або компенсувати його відсутність та бути зв'язаним з ERв [55]. Суттєвим чинником ризику серцево-судинних ускладнень є зміни прокоагулянтного та антифібринолітичного балансу системи гемостазу в умовах гіпоестрогенії. Суттєве збільшення у постменопаузі рівнів фібриногену, фактора VII згортання крові, інгібітора активатора плазміногену 1-го типу та ін. є підґрунтям зростання кількості серцево-судинних катастроф через венозну тромбоемболію та артеріальний тромбоз [56]. Цьому також сприяє зростання в ендотеліоцитах вмісту ендотеліну-1 та тромбоксану А2 і зменшення NO та простацикліну, що є ознакою пригнічення антикоагуляційної і протиадгезивної дії ендотелію судин щодо лейкоцитів та тромбоцитів.

Старінням сполучної тканини (зменшенням еластичності та резервних можливостей для відновлення) на фоні зниження рівня естрогенів пояснюється поява у більш ніж 30 % жінок в період клімаксу дегенеративних змін опорно-рухового апарату (артрози, остеопенія, остеоартрити, зміни хрящів, суглобових зв'язок, зменшення м'язової сили та остеопороз) [10, 57]. Естрогени беруть участь у формуванні скелету організму під час його росту, підтримують мінеральний гомеостаз і сприяють максимальному накопиченню кісткової маси [58]. З настанням пери- та постменопаузального періоду ризик розвитку остеопорозу (ОП) зростає практично вдвічі, а частота переломів шийки стегна

— з 2 % у жінок до 45 років до 6 % між 45 та 65 роками і до 33 % у 75 років. На гонартроз страждає 64 % жінок у перименопаузі або впродовж 5 років після менопаузи чи овaріоектомії, що також пов'язується зі зменшенням м'язової сили. У кістковій тканині наявні ER обох типів, які пов'язані з генами ESR1 (ERα) та ESR2 (ERβ), зокрема в остеокластах та остеобластах. Зв'язуючись з ними, ЖСГ пригнічують резорбцію кісткової тканини, тоді як в умовах дефіциту естрогенів починає переважати процес кісткової резорбції, знижується їхня маса. При цьому погіршується стан коартикальних та трабекулярних структур кістки, це підвищує ламкість кісток у різних відділах хребта.

Розглядають щонайменше кілька механізмів розвитку ОП в умовах дефіциту естрогенів. Серед них — зменшення продукування кальцитоніну, що знижує рівень кальцію шляхом пригнічення кісткової резорбції та канальцієвої реабсорбції кальцію. При цьому зростає продукування різних прорезорбтивних цитокінів та їхніх рецепторів, зокрема ІЛ-6, що сприяють остеокластогенезу і гальмують апоптоз остеокластів [59]. Після менопаузи суттєво зменшується вміст вітаміну D, який безпосередньо бере участь у регуляції кальцієво-фосфорного обміну [51]. Тож однією з причин може бути естроген-дефіцитна ЕД, що визначає умови для погіршення кровопостачання, мікроциркуляції, призводить до порушень остеогенезу та остеорепарації [60]. Слід також відзначити велику кількість причин, які можуть призводити до розвитку вторинного ОП — різні ендокринопатії, порушення кальцієвого метаболізму, неповноцінне харчування, мальабсорбція, запалення, малорухливий спосіб життя, системні захворювання, алкогольна і тютюнова залежність, вживання препаратів ризику, зокрема глюкокортикоїдів, генетична схильність, а також період вагітності та лактації, що вважають проявами пременопаузального ОП [61]. У механізмі розвитку ОП суттєве значення належить зсуву про-/антиоксидантного балансу в організмі. Відомо, що на фоні оксидативного стресу у жінок знижується оптична щільність кісток, а в експерименті дефіцит

кісткової маси виявлявся ще до зниження сивороткового рівня естрогенів, але на фоні підвищення утворення АФК. Антиоксидантна терапія разом із введенням естрогенів чи андрогенів віддзеркалюється позитивним антиостеопоротичним ефектом [62]. Механізм впливу оксидативного стресу полягає в активації фактора NF-κB, що, у свою чергу, підвищує продукування цитокінів та остеокластогенез.

Отже, пізні менопаузальні порушения презентуються підвищеним ризиком кардіоваскулярної патології, ОП та хворобою Альцгеймера. У жінок у період кліматерію частота ішемічної хвороби серця підвищується в 3 рази, інсульту — в 7 разів, а частота постменопаузального ОП складає 85 % від усіх випадків первинного остеопорозу [63]. Це надає проблемі раціонального менеджменту клімактерічних розладів високого соціально-економічного значення.

Лише у 20 % жінок вищеописані фізіологічні зміни в організмі відбуваються на фоні загальних вікових перетворень, без вираженої гіпотрофії статевих органів у преклімактеричному періоді та фатально не впливають на життєдіяльність та функції організму.

1.3 Фармакологічна корекція менопаузального синдрому гормональними лікарськими засобами

На сьогодні МГТ залишається «золотим стандартом» терапії клімактерічного синдрому, оскільки ефективність доведена чиленними клінічними випробуваннями. Водночас її широке використання та довготривала прихильність залишаються проблемою сучасної медичної практики. У розвинутих європейських країнах препарати МГТ застосовують тільки 37 % жінок, старших за 50 років, у США — 25 %, країнах Латинської Америки — 12,5 %, Японії — 4 %, а в Україні не — 2–3 % жінок, що її потребують [64]. Найбільша ефективність та безпека МГТ залежить від

своєчасного початку терапії, коли ще відкрите «вікно терапевтичної можливості» [65].

Для лікування симптомів клімактеричних розладів використовують натуральні естрогени або їхні аналоги. Найбільш поширеними активними фармацевтичними інгредієнтами для МГТ є 17в-естрадіол або його ефір — естрадіолу валерат. Вони мають однакову фармакокінетику й фармакологічні ефекти, швидко всмоктуються і метаболізуються у кишківнику та печінці, біологічна активність Е2 при пероральному застосуванні складає 5 % [66]. Розроблено значну кількість лікарських форм для ефективної та безпечної МГТ: таблетки (пероральний шлях уведення), пластирі, гелі (трансдермальний); імпланти (підшкірний), креми, песарії, кільця (інтравагінальні), спіралі (маткові терапевтичні системи).

Замісна терапія естрогенами складає сутність МГТ. Але фармакологічна активність препаратів може різнитися залежно від виду естрогену або лікарської форми. Так, фармакологічна активність Е2 при пероральному застосуванні становить близько 5 % [66]. Підставою для розробки гормональних препаратів локальної дії стало виявлення в тканинах піхви жінок у постменопаузі специфічного зв’язування Е3, якого не було у тканинах матки [66]. Чутливість ER до Е3 у 10 разів менша, ніж до Е2, а спорідненість рецепторів піхви та ендометрію до гормонів однакова [66]. Важливими були дані про те, що після одноразового застосування Е3 зв’язок комплексу естроген-ER та хроматину ядра клітини існує лише 1–4 години, чого не вистачає для індукування повної утеротропної реакції, включаючи проліферацію ендометрію. Хоча за умов багаторазового застосування Е3 (2–4-кратно) або при повільному його вивільненні з лікарської форми гормональна активність підвищується [67].

При пероральному застосуванні гормони підлягають ефекту першого проходження, тобто надходять спочатку в портальний кровотік і тільки після проходження через печінку — у системний. За рахунок метаболізму може

зменшуватися біодоступність естрогенів. Трансдермальний шлях введення підвищує біодоступність гормонів через уникання кон'югації в печінці. Естрогени при місцевому застосуванні діють після локальної дифузії або вагінальної абсорбції. Після утворення достатньої концентрації естрогени досягають ER у органах-мішенях і викликають відповідні фармакологічні ефекти. Не можна повністю виключити, що до генітального тракту естрогени можуть надходити і через загальний кровотік, тому що навіть при місцевому застосуванні у плазмі крові швидко зростає концентрація некон'югованого Е3 [67]. З метою уникнення індукції гіперпластичних процесів в ендометрії використовують комбіновані лікарські препарати, що містять поряд з естрогенами, гестагени або андрогени. Для досягнення стійкого ефекту необхідно вживати такі препарати протягом 5–7 років.

Велика кількість клінічних спостережень та експериментальних досліджень свідчить про позитивний вплив препаратів для МГТ на окремі симптоми гіпоестрогенного стану. За даними проспективного (10 років) рандомізованого дослідження WISDOM (жінки після менопаузи, вік 50–69 років, понад 22 тис. осіб), проведеного у Великій Британії для оцінки корисності та ризиків МГТ, у жінок, які отримували відповідну терапію, зменшились виразність і частота вазомоторних симптомів, поліпшувалася статева функція, покращувався сон [68]. Зменшувалася частка жінок, які скаржились на припливи, пітливість, болі в суглобах і м'язах, інссомнію, сухість піхви. Встановлено, що МГТ виявилася недостатньо ефективною для корекції психоемоційних, когнітивних розладів, клімактеричної депресії з нападами пригніченого настрою, плаксивості, зниження потягу до життя, зменшення активності, відчуття вікових змін, тривожних побоювань за своє здоров'я. Позитивних результатів у жінок у постменопаузальному періоді, які мали такі скарги, вдавалося досягти застосуванням негормональних ліків (синтетичних сполук або препаратів рослинного походження), що мають антиоксидантний, мембранопротекторний, антигіпоксичний, ноотропний та

інші види фармакологічної дії, антидепресантів з групи селективних інгібіторів зворотного захоплення серотоніну [69, 70].

Доведено, що МГТ покращує стан шкіри та навіть може сприяти зворотному розвитку багатьох несприятливих змін, наприклад прискореної атрофії дерми [71]. Це обумовлено позитивним впливом естрогенів на вміст у шкірі гіалуронової кислоти, глікозаміногліканів, посиленням проліферації кератиноцитів уже після трьох місяців лікування. Зростання вмісту колагенових волокон становить 1,8–6,5 %, що в сукупності призводить до збільшення товщини шкіри. МГТ уповільнює появу зморшок, але можливе підвищення секреторної активності сальних залоз у жінок зі збереженою маткою, що проявляється акне та себореєю, чому запобігає додавання прогестагену [19, 25].

Уява про позитивний вплив МГТ для захисту серцево-судинної системи тривалий час базувалася на епідеміологічних даних про меншу частоту серцево-судинних катастроф у жінок репродуктивного віку порівняно з чоловіками та зникнення цієї різниці після настання клімаксу. Нині вважають, що механізм кардіопротекторної дії естрогенів полягає у збільшенні міокардіальної експресії гена ендотеліальної NO-синтази через активатор PI3-кіназний сигнальний шлях. Причому за збільшення рівнів eNOS у міоцитах відповідають саме ERв, що посилює вазодилатацію судин.

У молодому віці естрогени мають антиоксидантну дію, зменшують запалення, сприяють вазодилатації судин, захищають кардіоміоцити та ендотеліоцити шляхом активації фактора NFкB, підвищуючи синтез білків теплового шоку [46]. Результати великих проспективних дослідженнях WISDOM (2008) та WHI (Women'sHealth Initiative 2002) продемонстували, що гормональна терапія, яку тривалий час отримували жінки, не тільки не зменшила у них ризик серцево-судинних захворювань, а й навіть збільшила його [72]. У жінок, які приймали комбіновану естроген-прогестеронову МГТ, на 30 % зріс ризик розвитку ішемічної хвороби серця та раку молочної залози і

на 40 % — інсульту, до того ж незначно зростав ризик розвитку деменції без клінічно значущого поліпшення якості життя. Водночас зменшувалася кількість жінок, які скаржились на вазомоторні симптоми, болі у суглобах та м'язах, сухість піхви [73].

Аргументами на користь МГТ є позитивні зміни таких показників, як ІР та вміст ХЛ ЛПНЩ і ХЛ ЛПВЩ. Глибший аналіз, в якому враховувався вік початку ЗГТ відносно віку менопаузи, наявності в анамнезі гормональної терапії та даних про початковий стан здоров'я (індекс маси тіла, артеріальний тиск, ліпідний профіль, рівень глюкози натще, тютюнопаління), дав можливість сформулювати гіпотезу «синхронізації», згідно з якою існує ідеальний час — «вікно терапевтичних можливостей», — протягом якого МГТ є найбільш корисною [74]. Вона базується на іншому проспективному рандомізованому дослідженні, в якому відзначена менша частота смертності, інфаркту міокарда, серцевої недостатності, відсутність зростання випадків легеневої емболії або тромбозу глибоких вен через 10 років лікування у жінок, якщо МГТ була розпочата в межах 3–24 місяців після менопаузи [75].

Отже, питання міри користі чи ризику МГТ у постменопаузальному періоді залишається дискусійним, дотепер не проведено плацебо-контрольованих досліджень щодо безпеки такого тривалого лікування або деякі з них ще тривають (the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS) and the Early vs. Late Intervention Trial with Estradiol (ELITE) [46, 73, 76]. Своєчасна МГТ може стримувати процеси резорбції кісткової тканини при гіпоестрогенних станах і знижувати на третину ризик переломів. Цьому сприяє і застосування препаратів кальцію, вітаміну D та антирезорбентів — селективних модуляторів ER (наприклад, ралоксифену, який запобігає втраті кісткової маси і знижує на 30–50 % ризик переломів хребців у жінок у постменопаузі), бісфосфонатів, похідних кальцитоніну, стронцію ранелату та подібних до них за ефективністю препаратів [77]. Всупереч очевидним перевагам МГТ для гальмування розвитку постменопаузального ОП,

стандартом лікування вважається використання бісфосфонатів з солями кальцію та вітаміном D у дозі більш ніж 800 МЕ на добу [77]. З припиненням МГТ ризики втрати міцності кісток відновлюються, хоча ще впродовж кількох років ризик переломів залишається меншим [77].

Після ретельного опрацювання результатів досліджень WHI (2002) була уточнена ефективність МГТ відносно генітоуринарних розладів. Найбільш вагомою підставою для призначення МГТ є симптоми генітоуринальної атрофії (сухість, свербіж, печія, диспареунія, вагінальні виділення, опущення стінок піхви), зокрема й тому, що ефективність негормонального лікування близька до ефективності плацебо. Оскільки настороженість викликала висока ймовірність стимуляції проліферативної активності ендометрію з ризиком виникнення його гіперплазії або карциноми, то для підвищення ефективності МГТ частіше рекомендують місцеву, локальну терапію естрогенами. Системна гормональна терапія (пероральна та ін.) доцільніша при поєднанні вагінальної атрофії з іншими клімактеричними розладами, хоча відомо, що у 30–44 % випадків генітоуринарні симптоми суттєво не зменшуються. Натепер створюються комбіновані лікарські препарати для системної МГТ із мінімальною кількістю 17в-Е2 та дідрогестерону (прогестину), терапія якими зменшує втрату кісткової тканини, позитивно впливає на метаболічні показники (ЛПНЩ, ЛПВЩ, ІР) та серцево-судинну систему [78].

Застосування топічних форм лікарських засобів (песарії та креми з Е3, вагінальні таблетки) нині вважається більш безпечним, оскільки лікувальні засоби на основі Е3 виявили більшу ефективність порівняно з Е2 у жінок у постменопаузі [79]. Дискусійним лишється питання щодо тривалості терапії, однак більшість клініцистів вважають, що для досягнення стійкого ефекту потрібен достатньо тривалий час [80]. Використання топічних форм з естрогенами вже через 3 міс. дає можливість помітно покращити стан слизової оболонки піхви, а після закінчення лікування мати pH вагінального секрету нижчим за 4,0, домінування лактобацил (у 96 % пацієнток), концентрація яких

досягала норми майже у 70 % жінок, з нормалізацією видового складу лактобацил [80].

За будь-яким способом уведення естрогенів через 6 міс. після початку МГТ у всіх жінок спостерігалися позитивні зміни вагінального мікробіоценозу, що переконує в необхідності проведення терапії протягом 18–36 міс. [67]. Відомо, що використання Е3 ефективне також для профілактики рецидивних інфекцій сечовипускного тракту у літніх пацієнтів [64].

В Україні зареєстрованим препаратом Е3 є Овестин та вагінальний крем «Колпотрофін». Крем містить синтетичний естроген проместрин (П) дозою 10 мг/г. При лікуванні зазначеними препаратами максимальна концентрація Е3 у плазмі крові досягається через 1–2 год, а середня концентрація становить близько 40 мг/мл. У крові Е3 зв'язується з альбуміном, під час проходження через печінку метаболізується та виводиться з сечею. При лікуванні покращується кровообіг у стінках піхви, проліферація епітелію піхви, підвищується синтез глікогену внаслідок чого зменшується показник pH і відновлюється популяція лактобацил. Відновлюється кровопостачання усіх шарів уретри, її м'язовий тонус, кількість і якість колагенових структур, проліферативні процеси в уротелії та зростання кількості слизу, що обумовлює зменшення симптомів стресового нетримання сечі. Відзначено покращення трофіки, кровообігу і скорочувальної активності м'язів тазового дна, що є позитивним для утримання органів малого таза та зменшення симптомів нетримання сечі, запобігання розвитку висхідних інфекцій [81]. Овестин ефективний при лікуванні симптомів хірургічної менопаузи [82].

Інколи вважають, що відсутність системної дії у топічних форм естрогенів МГТ запобігає використанню таких препаратів для лікування проявів КС або у профілактиці ОП і серцево-судинних захворювань. Проте досі відсутні великі плацебо-контрольовані дослідження, а ті, що були проведені, продемонстрували відсутність об'єктивного поліпшення в істинному нетриманні сечі при напруженні в 83 жінок у постменопаузі після 3 міс.

системної МГТ. Вище наводилися дані про асоційованість кислотності вагінального секрету та складу мікробіоценозу. При зростанні величини pH вагінального середовища як альтернатива МГТ запропоновано застосовувати препарати з молочною кислотою, які здатні створювати кислотний резерв, що допомагає відновленню мікрофлори піхви і захищає від генітальних інфекційних захворювань.

Нині проводиться цілеспрямований пошук серед похідних Е2 нових хімічних сполук з відсутністю небажаних мітогенних ефектів естрогенів. Так, синтезована сполука ПЕ0607, яка на моделі метаболічного синдрому на тлі гіпоестрогенії у самок лабораторних щурів гальмує ІР, поліпшує толерантність до вуглеводів і чутливість до інсуліну, знижує приріст маси тіла та вісцерального жиру, ослаблює оксидативний і нітрозивний стрес [83], сприяє зниженню приросту маси тіла, абдомінального ожиріння, гіперхолестеринемії [84]. Дослідники зазначають, що ця сполука виявляє менш виразний порівняно з 3,17-β-естрадіолом вплив на проліферативні процеси у матці, що може суттєво знизити ризик побічних ефектів при її використанні.

Наведені дані свідчать, що на сьогодні МГТ є найбільш ефективним заходом для усунення більшості проявів дефіциту естрогенів різної етіології. Незважаючи на довгу історію розробки гормональних засобів для лікування симптомів гіпоестрогенового стану, не можна стверджувати, що розроблені цілком безпечні та ефективні лікарські препарати, користь від яких переважає ризики таких ускладнень, як судинні та тромботичні катастрофи, онкозахворювання, що не зникають після скасування МГТ [85]. Отже, зберігається нагальна потреба у пошуку нових методів превенції та лікування розладів, пов’язаних із гіпоестрогенними станами, зокрема серед похідних фітоестрогенів або сполук природного походження.

1.4 Ресвератрол та перспективи розробки на його основі нових лікарських засобів топікальної дії для лікування менопаузального синдрому

Вищенаведені дані свідчать, що найбільш ефективним методом попередження та лікування проявів дефіциту естрогенів різної етіології є МГТ. Однак тривала гормональна терапія асоціюється з ризиком розвитку побічних ефектів, серед яких підвищення ризику виникнення ішемічної хвороби серця, інсультів, інфарктів, тромбозів, а також пухлин молочної залози [86–88]. Оскільки існує проблема негативного ставлення жінок до гормональних засобів (гормонофобія), частота призначення МГТ у країнах Європи становить у середньому не більше 30 % [28]. За даними літератури, зростає кількість публікацій щодо використання альтернативного лікування із використанням фітоестрогенів. Відомо, що більш ефективними та безпечними щодо розвитку побічних реакцій є рослинні екстракти, які містять фітоестрогени.

Фітоестрогенвмісні препарати розглядають як альтернативу гормонотерапії, оскільки вони виявляють естрогеноподібну, антиоксидантну, протизапальну, антимікробну, протипухлинну фармакологічну дію [87]. Використання рослинних екстрактів, що містять фітоестрогени, особливо на початкових етапах розвитку клімактеричного синдрому доведена численними клінічними випробуваннями [89].

Важливим завданням сучасної фармацевтичної науки є розробка нових лікарських засобів, які здатні доповнити або замінити МГТ, поєднуючи ефективність гормональних засобів, мінімізувати побічні ефекти та високу тропність до органів-мішеней. Таким критеріям відповідають препарати, що містять фітоестрогени. Вони належать до поліфенолів, однак на фармацевтичному ринку України представлені обмеженим асортиментом лікарських засобів, а у вигляді вагінальних лікарських форм майже відсутні.

Похідні фенольних сполук, що виявляють різноманітну фітотерапевтичну дію [90], серед них еуфлавони, ізофлавони, таніни, стільбени тощо.

Структурна подібність окремих флавоноїдів з молекулою естрадіолу об'єднала групу фітоестрогенів, які після гідролізу, що відбувається в кишечнику, утворюють аглікони зі слабкою естрогенною активністю (вовчуг польовий, софора японська) [93]. У табл. 1.1 наведено рослини — джерела фітоестрогенів.

Таблиця 1.1

Рослини — джерела фітоестрогенів

Клас фітоестрогенів	Лікарська рослина
Ізофлавоноїди (геністеїн, дайдзеїн, біоханін А, формононетин, даідзеїн)	Соя щетиниста, квасоля звичайна, конюшина червона, сочевиця звичайна, хміль звичайний
Лігнани (фезалін, пінфезенол)	Цільні зерна (жито, рис), горіхи і насіння, фрукти (цитрусові, яблука, вишня), овочі (шпинат, морква, броколі, часник, петрушка), різні види сосен, кунжут звичайний
Куместани (куместрол, 4-метоксикуместрол)	Конюшина червона, люцерна посівна
Стільбени (ресвератрол, полідатин)	Горець японський, виноград культурний, арахіс культурний

Ізофлавоноїди вважають основним класом речовин, що виявляють естрогенну активність [92]. Ці малотоксичні сполуки мають широкий та різноманітний спектр біологічної активності, фітотерапевтичний ефект та діють як слабкі естрогени або антиестрогени. Також мають здатність зв'язуватися з ER, причому більшість фітоестрогенів мають більшу активність до ERβ, чим пояснюються відмінності естрогеноподібного ефекту порівняно з естрадіолом [93, 94]. За даними літератури, на сьогодні існують дослідження, що при застосуванні фітоестрогенів виникає негативний вплив на репродуктивну систему обох статей (чоловіків та жінок) на різних рівнях регуляції [95–97]. При неконтрольованому вживанні фітоестрогенів з

продуктами харчування відмічено зміни у сироватці крові вмісту статевих гормонів та гонадотропних [98–100], зміни статевої поведінки [100], порушення статевого циклу у самок [100], порушення сперматогенезу у самців, тривалість менструального циклу та зменшення плідності [100].

Також існують позитивні докази впливу ресвератролу на здоров'я завдяки антиоксидантним властивостям, здатності попереджати і пригнічувати розвиток пухлин або затримувати їх ріст завдякі пригніченню онкогенної експресії [74, 101]. Є дані, що під час функціонування власних гонад фітоестрогени можуть діяти як антиестрогени та конкурентно займати відповідні рецепторні місця. Таким чином вони послаблюють дію активних ендогенних естрогенів і запобігають розвитку естрогенопосередкованих захворювань [102].

За даними наукових джерел, існує багато позитивних доказів впливу фітоестрогенів на організм при віковій або штучній естрогеновій недостатності. Застосування фітоестрогенів зменшує інтенсивність менопаузальних розладів [103], таких, як припливи жару, ОП, позитивно впливають на артеріальний тиск, стан шкіри, слизових оболонок та когнітивні характеристики [104], але за ефективністю можуть поступатися гормоновмісним засобам [105]. На основі природних фітоестрогенів розроблено дієтичні добавки (їх значно більше) та лікарські засоби (Онагрис, Естровел, Мастодінон, Циклодінон, Клімадинон, Клімаксан, Ременс, Фемікапс, Іноклім та ін).

Препарат Клімадинон має естрогеноподібний ефект та зв'язується з ER у лімбіко-ретикулярному комплексі, чинить позитивний вплив на психічний статус, має седативні властивості, також нормалізує синтез та обмін дофаміну, серотоніну та норадреналіну, активно впливає на центр терморегуляції, що дуже важливо при припливах жару. До його складу входить екстракт циміцифуги, ефективність препарату Клімадинон досягала 62,5 %, але суб'єктивно — 85 %.

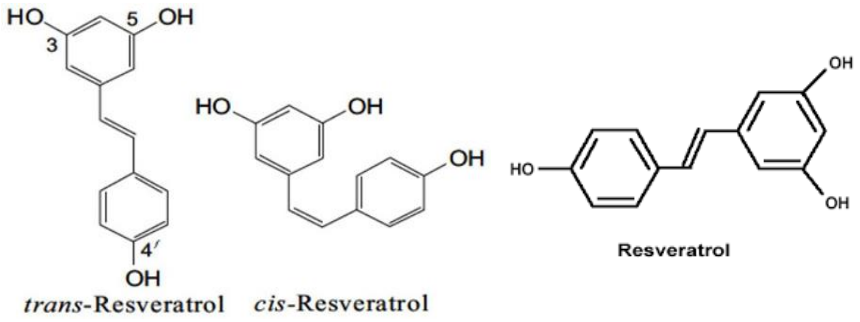
Після закінчення лікувальної терапії у пацієнток із МС різного ґенезу знижувався рівень холестерину, ЛПНЩ, зростав рівень ЛПВЩ та знижувався індекс атерогенності [106]. При лікуванні МС легкої та середньої тяжкості препарат Клімадинон виявляв найбільшу ефективність відносно таких симптомів, як припливи жару, головний біль, інсомнія, дратівливість, а при додатковому призначенні препаратів магнію [107] мав потенціювальний ефект та відсутність небажаних ускладнень. Препарат Менорил є дієтичною добавкою для профілакти та полегшення симптомів МС. До його сладу входять ресвератрол — 30 мг, синтетичний геністеїн — 30 мг, вітамін D_3 — 0,01 мг, вітамін K_1 — 0,12 мг. Тяжкість МС оцінювали за модифікованим менопаузальним індексом (ММІ), який враховував характер нейровегетативного реагування, ендокринні, метаболічні та психоемоційні розлади. Тривале застосування (до 6 міс.). Менорилу приводило майже до 6-разового зниження ММІ, який враховував психоемоційні розлади, характер нейровегетативного реагування, ендокринні, метаболічні розлади, за якими оцінювали тяжкість МС [107, 108].

При естрогенозалежному ОП застосування фітоестрогенів показало меншу ефективність ніж застосування МГТ у жінок, але за даними літератури результати експериментів на тваринах свідчать про участь фітоестрогенів у метаболізмі кісткової тканини. Лікарські засоби з фітоестрогенами можуть покращувати якість життя жінок із МС, зменшувати ризик розвитку пухлин, їх можна призначати як альтернативну терапію МС при наявності протипоказань до МГТ. Оскільки препарати, які містять фітоестрогени, важаються нетоксичними, їх можна призначати для тривалого застосування і профілактики та лікування симптомів МС [109].

Лігнани — біологічно активні сполуки, які останніми роками широко вивчаються. Вони проявляють різноманітні фармакологічні ефекти: протимікробний, протипухлиний, адаптогений та стимулювальний та ін.

Останнім часом увагу дослідників привертає ресвератрол, що виявляє естрогеноподібну активність.

Ресвератрол (3,5,4-примістрин-тригідростільбен) — природний фітоалексин групи рослинних поліфенолів. Ця сполука синтезується в листях винограду у відповідь на інфікування патогенними грибами роду *Botritis* та ін. і є рослинним антибіотиком, але не є необхідним метаболітом винограду [110]. Ресвератрол існує у вигляді *цис*- та *транс*-ізомеру, а в природі частіше перебуває у вигляді глікозильованих форм (рис. 1) [111].



а — *транс*-ресвератрол б — *цис*-ресвератрол в — формула ресвератролу

Рис. 1 Структурна формула ресвератролу (*цис*- та *транс*-ізомери).

Ресвератрол виявляє естрогеноподібну активність, зв'язуючись з тими ж рецепторами, що й естрадіол (Е2). На відміну від Е2 та диетилстільбестролу, які стимулюють розвиток пухлинного процесу, ресвератрол має цитоксичну дію завдяки інгібуванню рибонуклеотидредуктази та здатності пригнічувати синтез ДНК. У високих дозах ресвератрол є агоністом рецептора Е2. Ресвератрол зменшує патологічні прояви дефіциту естрогенів, зокрема приводить до редукції неврологічних симптомів, розладів серцево-судинної системи, гальмує розвиток остеопорозу. При цьому також змінюється стан шкіри і слизової оболонки статевих органів, уповільнюється розвиток атрофічного вульвовагініту [112]. Водночас рекомендують вітамінні засоби

(препарати вітамінів D, E) та рослинні засоби, у тому числі ресвератрол завдяки його антиоксидантній, антибактеріальній, протизапальній, протипухлинній дії [113].

Фітоестрогенна активність ресвератролу обумовлює його призначення при остеопорозі та менопаузі. Препарат підвищує кількість остеобластів у кістковій тканині, інтенсифікує остеогенез на фоні зменшення адипоцитів [114].

Ресвератрол чинить антипроліферативну дію при гіперпластичних процесах, запобігає окисненню ЛПНЩ (антиатерогенна дія), виявляє кардіо- й нейропротекторний і протизапальний види активності. Зменшуючи вегетативні прояви менопаузи, цей препарат гальмує розвиток процесів старіння [115].

Позитивний ефект ресвератролу при серцево-судинних захворюваннях значною мірою пов’язаний з ендотелійзалежною вазодилатацією, пониженням артеріального тиску, попередженням гіпертрофії міокарда внаслідок зменшення гемодинамічних навантажень. У клінічних дослідженнях встановлено позитивний вплив на серцево-судинну систему (ССС) при вживанні ресвератролу (дозами 150 мг/добу та вище): знижується систолічний артеріальний тиск, а діастолічний не змінюється [116, 117]. Плейотропні ефекти ресвератролу на ССС також пов’язують з впливом на аденозинмонофосфат активуючу протеїнкіназу, потужною антиоксидантною активністю, здатністю стимулювати утворення оксиду азоту. Встановлено, що ресвератрол відіграє важливу роль у процесах ішемічного прекондиціювання міокарда, що має істотне значення для боротьби з ішемічними процесами, надмірним ПОЛ та ушкодження міокарда шляхом активації сигнального шляху Akt та Bcl-2 [118]. Застосування ресвератролу в експерименті на моделі інфаркту міокарда внаслідок оклюзії лівої передньої низхідної коронарної артерії зменшує розміри інфаркту і поліпшує скорочувальну функцію серця [119]. Ефективність ресвератролу при ішемії пояснюють інгібуванням агрегації тромбоцитів, прекондиціюванням міокарда, впливом на регенерацію тканин в

зоні інфаркту [120]. Експериментально показано, що ресвератрол захищає від шкідливого впливу реперфузії міокарда після ішемії, понижуючи аритмічні прояви та зменшуючи розміри інфаркту [121].

У дослідах in vitro ресвератрол статистично знижував апоптоз кардіоміоцитів порівняно з контролем при відтворюванні ішемії-реперфузії. Виявили пониження експресії генів, які відповідають за утворення кардіоміоцитами *in vitro* мозкового натрійуретичного пептиду, ядерного фактора NF-kB2, Е-селектину, тропоніну та фактора некрозу пухлин-альфа. При дослідженні ЦНС ресвератрол проявляв нейропротективні властивості. Встановлено, що лікування ресвератролом приводить до зменшення патологічних проявів та гальмує прогресування таких нейродегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона [122, 123]. Експериментально доведено, що ресвератрол прискорює регенерацію нейронів й утворення нових нервових зв'язків в пошкоджених ділянках мозку, відновлює когнітивні здібності у неврологічних хворих. Ресвератрол здатний зв'язувати іони міді, чим разом із антиоксидантною дією пояснюється його нейропротекторний ефект, може зменшувати кількістьта розмір бляшок, що виникають при атеросклерозі та нейродегенеративних захворюваннях, при цьому у пацієнтів покращуються моторика та когнітивна функція [124].

Основний чинник багатьох захворювань є окисний стрес, ресвератрол захищає за допомогою різних молекулярних шляхів окисно-відновні процеси.

Ресвератрол виявляє ранозагоювальну, капілярозміцнювальну, протимікробну, протигрибкову, противірусну фармакологічну дії. Протизапальні властивості ресвератрол демонструє завдяки здатності модифікувати експресію мікросомальної РНК-663, пригнічуючи продукування прозапальних цитокінів [124].

На відміну від естрогенвмісних препаратів, ресвератрол виявив багатогранність фармакологічної дії в експерименті, клінічну ефективність та сприятливий профіль безпеки, що відкриває перспективи розробки на його

основі препаратів місцевої й системної дії за умов комбінованого введення (топічних і резорбтивних лікарських форм), використання при гіпоестрогенових станах з метою фармакологічної корекції менопаузальних розладів [125].

1.5 Використання гіалуронової кислоти як інноваційний підхід до корекції менопаузального генітоуринального синдрому

«Гіалуронова кислота — природний полімер, глікозаміноглікан, що складається з повторювальних ланцюгів N ацетил-D-глікозаміну і глікоронової кислоти (рис. 2).

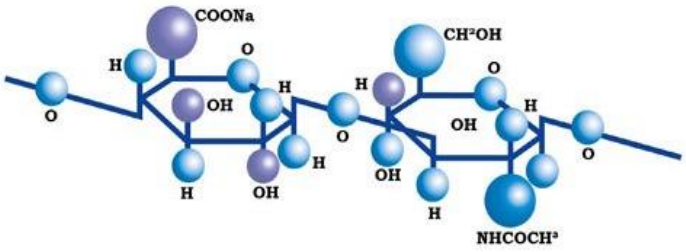


Рис. 2 Структурна формула гіалуронової кислоти.

В організмі людини, тварин і бактерій вона відіграє важливу біологічну функцію. З віком функція генорегулюючих білків знижується, проте природні полімери, а саме гіалуронова кислота проникає в шкіру для формування міжклітинних комплексів, які відповідають за диференціацію кератоцитів. Завдяки реологічним властивостям розчини низькомолекулярної гіалуронової кислоти дозволяють набувати в'язкопружних властивостей гелю. Також має значення мала рухливість ланцюгів водневих зв'язків. Завдяки стереохімії дисахаридів, молекула, що входять до складу гіалуронової кислоти, є енергетично стабільною. Гіалуронова кислота за рахунок міжмолекулярної взаємодії утворює тривимірну структуру для водорозчинних молекул. Гідрофобні ділянки, які регулярно повторюються, сприяють взаємодії з білками гідрофобного типу та клітинними мембранами [127]. Гіалуронова

кислота є важливим компонентом у тканинах, впливає на регенерацію, запалення, ангіогенез і проявляє репаративну дію. Завдяки зв'язку з білками, міжклітинною речовиною, колагеновими компанентами гіалуронова кислота створює буферний об'єм для пружності тканин, які були пошкоджені при травмах, хірургічних втручаннях [128]. Гіалуронова кислота завдяки в'язкопроникним властивостям може покривати епітелій. Біоматрикс має унікальні властивості, що може сприяти покращенню мітотичної активності та клітинної адгезії [129].

Останнім часом дослідники багато уваги приділяють проблемі здорового старіння при менопаузі. Зміни, які відбуваються в жіночому організмі, зокрема стан шкіри, слизової оболонки піхви, обумовлюють розробку нових лікарських засобів. [130]. Серед властивостей гіалуронової кислоти — взаємодія з іншими глікозаміногліканами в процесі безперервного оновлення шкіри. Ця кислота вступає у зв'язок з білками, рецепторами, зв'язує воду та солі.

З метою корекції вікових змін досліджувались креми, гелі, лосьони і розчини для внутрішньошкірних ін'єкцій з вмістом гіалуронової кислоти в косметології на різні типи шкіри.

Для збереження довготривалого ефекту [131], що відновлює колаген-еластиновий матрикс дерми у жінок 48–60 років, одним із способів застосування гіалуронової кислоти є лазерофорез. Гіалуронова кислота бере участь в транспорті і розподілі води в іонному обміні [132], гальмує деградацію тканин при старінні. Гідратовані ланцюги гіалуронової кислоти понижують дифузію білків електролітів, сприяють організації шунта для клітинного руху в старіючій шкірі.

З роками відбуваються у людей старіння обличчя, рук, шиї, декольте, а також інтимної зони. Сучасна медицина виконує корекцію статевих органів ін'єкціями гелю гіалуронової кислоти між уретрою і вагіною. Такі дії повертають психологічний комфорт, забезпечують жінці форму, розмір та чутливість статевих органів [133].

Актуальною проблемою XXI століття важають лікування неінфекційних вагінітів, для лікування яких призначають гіалуронову кислоту [134]. Для лікування атрофічних вагінітів призначають лікарські засоби, які забезпечують вологість, до яких саме належить гіалуронова кислота.

Одним з перших препаратів з гіалуроновою кислотою в Україні, що був розроблений для коррекції атрофічних вагінітів, які виникають при клімаксі, був Гінодек. Гінодек — гінекологічний засіб, що містить декаметоксин, 0,5 % гіалуронової кислоти, лактатний буфер. Препарат показаний при інфекційних процесах статевих органів, має регенеруючий, протигрибковий, протизапальний, зволожуючий ефект і застосовується інтравагінально у вигляді гелю [134]. При взаємодії гіалуронової кислоти з водою утворюється дисперсійний матрикс, що має значення для підтримки еластичності слизових оболонок. Гіалуронова кислота при вагініті сприяє прискоренню клітинної проліферації, посилює ангіогенез, місцеву мікроциркуляцію, поліпшує гідродинаміку тканин, регенерацію тканин вагіни, утримує воду, заповнюючи простір між клітинами. Однією з оптимальних лікарських форм лікування вагінітів вважають вагінальні гелі для введення при появі сухості генітального тракту, меншої болючості, більшої площі охоплення та біоадгезивності до слизової оболонки [135].

За даними наукових джерел, через 12 тижнів при застосуванні гіалуронової кислоти спостерігаються виразний ранозагоювальний ефект навіть важких хворих при лікуванні синдрому діабетичної стопи. Показник повного загоєння у пацієнтів при призначенні аплікації з гіалуроновою кислотою був вищим порівняно з пацієнтами, які отримували стандартну терапію [136].

Гіалуронова кислота також сприяє відновленню фізіологічних бар'єрних властивостей генітального тракту, укріплює тканинний каркас стінки сечового міхура. Кислота входить до складу епітеліальних клітин нижнього відділу генітального тракту, бере участь у процесах проліферації клітин, забезпечує

цілісність та головні фізико-хімічні властивості. Введення раз на тиждень у сечовий міхур препарату Інстилан, що містить гіалуронову кислоту і фосфатний буфер, дозволяє підвищувати вологість, усувати запалення сечовивідного каналу, заповнювати простір дефектів, сприяти загоєнню і таким чином позбавляє від болю при сечовипусканні та, відновлює бар'єрну функцію сечового міхура [137, 138].

Дослідження лікувальних властивостей гіалуронової кислоти тривають, при цьому встановлюються нові фармакологічні ефекти, що робить гіалуронову кислоту перспективним джерелом створення лікарських засобів майбутнього [139].

Теоретичне обґрунтування експериментальних досліджень наведено в таких публікаціях:

1. Зайченко, Г. В., Сініцина, О. С., Карпенко, Н. О., Риженко, І. М., & Стрига, О. А. (2019). Розлади жіночого здоров'я внаслідок вікового дефіциту естрогенів та їх корекція. *Журнал Національної академії медичних наук України, 2* (25), 211–221. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

2. Зайченко, Г. В., Карпенко, Н. О., Стрига, О. А., & Сініцина, О. С. (2018). Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури). *Проблеми ендокринної патології, 4*, 65–74. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

3. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Стрига, О. А., & Рубан, О. І. (2017). Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини, 4* (1), 21–30. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

4. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Стрига, О. А., Яковлева, Н. Ю., & Рубан, О. І. (2017). Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини, 1* (135), 33–42. *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

5. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Савченко, Н. В., & Стрига, О. А. (2020). Механізми кардіо- та вазопротекторної дії ресвератролу. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 14* (4), 223–234 https://doi.org/10.33250/14.04.223 *(Особистий внесок: огляд літературних джерел, аналіз результатів, узагальнення матеріалу).*

6. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., & Стрига, О. А. (18–20 жовтня 2017 р.). Теоретичне обґрунтування створення топічних препаратів на основі ресвератролу. *V Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей,* м. Запоріжжя. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вагінальні гелі комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, що досліджувалися, були розроблені на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету (м. Харків) під керівництвом д. фарм. н., проф. О. А. Рубан. Субстанція ресвератролу, яка була використана для виготовлення вагінального гелю, містила 50 % транс-ресвератролу рослинного походження, отриманого з рослини *Polygonum Cuspidatum* від виробника фармацевтичних субстанцій Naturex S.p.A (Франція), постачальник ТОВ «Компанія Євроімпекс» (серія № С091/004/А16). У своєму складі вагінальні гелі містили фітоестроген ресвератрол (Р), гіалуронову кислоту (ГК) та допоміжні речовини (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Склад досліджуваних тест-зразків вагінальних гелей комбінованого складу

Активні фармацевтичні інгредієнти та допоміжні речовини	Вміст, %
Ресвератрол	0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 %
Гіалуронова кислота	0,5 %
Альгінат натрію	0,50%
Аристофлекс AVC	1,5 %
Пропіленгліколь	10,0 %
Консервант	0,5 %
Молочна кислота	до pH 4,5
Вода очищена	до 100 %

Гіалуронова кислота, що увійшла до складу досліджуваних вагінальних гелей, має здатність зв’язувати воду, таким чином забезпечувати підтримку вологості в слизовій оболонці піхви, полегшувати міграцію клітин, виявляє зволожувальні, регенеруючі, ранозагоювальні види дії, має властивості лубриканту, посилює захисні функції генітального тракту.

Важливою складовою вагінального середовища є молочна кислота. У здорових жінок репродуктивного віку естрогени яєчників сприяють активній проліферації піхвових епітеліоцитів і синтезу ними глікогену. Глікоген, який накопичується переважно у поверхневих клітинах, що постійно злущуються та зазнають цитолізу, вивільняється і під впливом *Lactobacillus acidophilus* розкладається до молочної кислоти. Це зумовлює появу кислого середовища вагінального вмісту (pH 3,8–4,5), забезпечуючи поживний субстрат для звичайної піхвової мікрофлори та створюючи несприятливі умови для існування кокової флори. Таким чином забезпечується захист вагінального біотопу та формування власного мікробного пейзажу піхви [140–142].

Першим препаратом порівняння (не гормоновмісним) було обрано вагінальний гель Гінодек (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна), який містить 0,5 % гіалуронату натрію, молочну кислоту, 0,02 % декаметоксину та допоміжні речовини, що утворюють гелеву основу. Обидва вагінальних препарати мають однакову лікарську форму, два спільних компоненти (гіалуронан і молочну кислоту), мають однакові показання до призначення, а саме стани, що супроводжуються сухістю слизової оболонки піхви (атрофічні зміни слизової оболонки у менопаузальний період, подразнення, печіння, свербіж внаслідок частих спринцювань, мікротріщини); мають однаковий шлях уведення — вагінальний. Декаметоксин, що міститься у вагінальному гелі Гінодек, виявляє антимікробну, протигрибкову, протизапальну дію. У свою чергу, ресвератрол, за даними літератури, виявляє естрогеноподібний, антиоксидантний, ранозагоювальний, протизапальний, антибактеріальний, протигрибковий та протипухлинний види активності [125].

Склад новостворених вагінальних гелей з ресвератролом, гіалуроновою та молочною кислотами був теоретично обґрунтований, спрогнозовані можливі показання до призначення, що включали генітоуринальні прояви у менопаузальний період та при гіпоестрогенових станах різної етіології. Розробниками проведені попередні біофармацевтичні дослідження, що не

виявили негативних фармацевтичних взаємодій між компонентами лікарської форми, довели стабільність, прийнятний термін зберігання (2 роки), відповідність технологічному регламенту, були розроблені методи контролю якості.

Під час фармакологічних і токсикологічних досліджень було використано 126 аутбредних самок білих нелінійних щурів масою 202–240 г і віком 6–8 міс. З них 42 тварини були використані на етапі скринінгового дослідження; 24 — при дослідженні фармакологічних властивостей на моделі експериментального гіпоестрогенового стану у щурів (хірургічна кастрація), 30 самок щурів — при поглибленому вивченні фармакодинаміки на моделі хімічної кастрації, 30 тварин — при вивченні гострої токсичності.

Тварини були вирощені у розпліднику віварію Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Щури утримувались у стандартних умовах віварію: температура — 20–25 ºС, відносна вологість — 50–55 %, природне освітлення, раціон, рекомендований для цих видів тварин, питний режим ad libitum. При проведенні експериментів дотримувалися Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985) [143, 144].

Для скринінгових фармакологічних досліджень тварин випадковим чином розподіляли на експериментальні групи, в кожній з яких було по 6 самок (табл 2.2).

Для моделювання у тварин гіпоестрогенового стану, що супроводжується симптомами, подібними до симптомів менопаузи у жінок, видаляли основну гормонопродукувальну залозу — яєчники. Оваріоектомію самок (білатеральна оваріоектомія за Я. Д. Кіршенблатом, 1969) проводили під тіопенталовим наркозом в асептичних умовах [145].

Таблиця 2.2

Експериментальні групи та умови експерименту

Експериментальна група	Умови експерименту	Доза за лікарською фомою
Інтактний контроль (ІК)	Інтактні тварини	–
Контрольна патологія (КП)	Самки після білатеральної овариектомії	Вода для ін'єкцій, 0,1 мл/добу
Оваріоектомовані самки, яким через 5 тижнів після операції впродовж 28 діб інтравагінально уводили тест-зразки		
КП + гель з Р 0,5 % та ГК	Оваріоектомовані самки, яким і/в уводили 0,5 % гель з Р та ГК	0,1 мл/добу
КП + гель з Р 1 % та ГК	Оваріоектомовані самки, яким і/в уводили 1 % гель з Р та ГК	0,1 мл/добу
КП + гель з Р 2 % та ГК	Оваріоектомовані самки, яким і/в уводили 2 % гель з Р та ГК	0,1 мл/добу
КП + гель з Р 3 % та ГК	Оваріоектомовані самки, яким і/в уводили 3 % гель з Р та ГК	0,1 мл/добу
КП + гель Гінодек	Оваріоектомовані самки, яким і/в уводили гель Гінодек	0,1 мл/добу

Після проведення кастрації самки 5 тижнів утримувалися у вільному режимі, цей час був необхідний для розвитку гіпоестрогенемії, оскільки після видалення яєчників власні ендогенні естрогени циркулюють у крові ще 10–15 діб. На 35-й день експерименту вже на фоні гіпоестрогенемії, що розвивалася, за допомогою інсулінового шприца з атравматичним наконечником раз на добу впродовж 28 днів уводили по 0,1 мл тест-зразків вагінальних гелів, препарат порівняння «Гінодек».

З огляду на те, що гіпоестрогеновий стан — це складний симптомокомплекс, внаслідок якого відбуваються не тільки гормональни зміни, а й широкий спектр змін в організмі жінки, фармакологічну ефективність досліджуваних тест-зразків оцінювали за фізикальними, психосоматичними показниками стану тварин та лабораторними, мікробіологічними, морфологічними показниками стану тканин генітального тракту і вагінального секрету. Вимірювали динаміку маси тіла тварин; зміни

температури тіла самок щурів біля кореня хвоста (аналог симптому приливи жару у жінок); кислотність (pH) вагінального секрету; проводили визначення рухової і пошукової активності в тесті «відкрите поле»; досліджували мікробіологічний пейзаж піхви; макро- і мікроскопічний стан слизової оболонки піхви; рівень статевих гормонів у сироватці крові (естрадіолу, прогестерону та тестостерону); вивчали морфологічну структуру серця та кісткової тканини.

Вимірювання водневого показника (pH) вагінального середовища проводили двічі: за 24 год до початку уведення тест-зразків і через 24 год після останнього введення досліджувальних препаратів. Показник pH вагінального секрету визначали за допомогою одноразових вагінальних pH-тестів Citolab (DFI Co, Ltd, Корея). Універсальним маркером нормального гормонального статусу генітального тракту є кисле середовище вагінального секрету.

Для оцінки менопаузального генітоуринального синдрому у клінічній практиці широко використовують індекс вагінального здоров'я [146]. Інтегральна оцінка стану нижнього відділу генітального тракту (присінок вагіни та доступні до огляду початкові ділянки піхви) в експерименті являла собою загальну суму балів за всіма досліджуваними показниками макроскопічного та функціонального (здатність до підтримки pH у фізіологічному діапазоні) стану слизової оболонки.

I. Стан слизової оболонки піхви (колір):

0 балів — блідо-рожева (фізіологічний стан);

1 бал — рожева;

2 бали — яскраво-рожева, виражена гіперемія.

II. Наявність вагінальних виділень

0 балів — видима відсутність виділень (фізіологічний стан);

1 бал — незначні гнійні виділення;

2 бали — рясні виділення, мацерація тканини присінка піхви.

III. Стан шкірного покриву навколо присінка піхви

0 балів — відсутність змін шерстяного покриву навколо присінка піхви;

1 бал — ознаки мацерації та часткова відсутність шерстяного покриву;

2 бали — виражена мацерація піхви, відсутність шерстяного покриву.

IV. pH вагінального секрету

0 балів — діапазон значень 4–4,5 одиниць (фізіологічний стан);

1 бал — 4,7–5,7 од. — помірне збільшення pH;

2 бали — 5,7–7,0 од. — різке збільшення pH.

Вираженість гіпоестрогенового стану була прямо пропорційна кількості сумі балів.

Мікробіологічне дослідження вагінального секрету проводили за класичною схемою. Перший етап — відбір біологічного матеріалу для дослідження — здійснювали стерильними тампонами, які вносили в стерильні пробірки з тіогліколевим буферним розчином. Другий етап — розведення (від 10–2 до 10–10) — проводили тим самим буфером із використанням нової стерильної піпетки для кожного розведення. Отримані розчини наносили по 0,1 мл крапельно (методом прямого посіву) на лактоагар.

Поглиблені дослідження фармакодинаміки тест-зразка — лідера вагінального гелю з Р та ГК проводили на моделях хірургічної та хімічної (фармакологічної) кастрації самок щурів. Препаратом порівняння (гормоновмісним) на цьому етапі було обрано 1 % вагінальний крем Колпотрофін (виробник Тева Фармасьютикалз Юероп Б. В., Лабораторія ШЕМІНО, Нідерланди; серія: 6Н772), який містив синтетичний естроген проместрин 10 мг/г та допоміжні речовини. Проместрин, що міститься у вагінальному кремі Колпотрофін, виявляє місцеву естрогенну дію на слизову оболонку нижніх відділів урогенітального тракту, відновлює її трофіку, сприяє проліферації вагінального епітелію. При інтравагінальному введенні не чинить системної дії, тому не впливає на ендометрій, молочні залози та гіпофіз. Препарат має спільні показання до призначення: вагінальна атрофія, що

обумовлена дефіцитом естрогенів, затримка загоєння піхви, шийки матки і вульви після хірургічного втручання, фізіотерапії.

Розподіл тварин за експериментальними групами наведено у табл. 2.3

Таблиця 2.3

Експериментальні групи та умови експерименту

Експериментальна група	Умови експерименту	Доза за лікарською фомою
Інтактний контроль (ІК)	Інтактні тварини	–
Контрольна патологія (КП)	Самки після білатеральної оваріектомії	Вода для ін'єкцій, 0,1 мл/добу
КП + гель з Р та ГК	Оваріоектомовані самки, яким і/ваг уводили 0,5 % гель з Р та ГК	0,1 мл/добу
КП + крем з П	Оваріоектомовані самки, яким і/ваг уводили 1 % крем з проместрином	0,1 мл/добу

Після закінчення скринінгового і поглибленного досліджень тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під хлороформним наркозом. На аутопсію брали зразки тканин піхви, серця, кісток для макро- та мікроскопічних досліджень.

Зростання маси тіла у самок після видалення яєчників є непрямим підтвердженням відповідності моделі гіпоестрогенемії, що є проявом порушення ліпідного обміну, характерним проявом клімактеричного синдрому. Це може відігравати вирішальну роль у розвитку метаболічного синдрому, цукрового діабету 2 типу, ожиріння внаслідок порушення балансу рівня статевих гормонів у крові в менопаузальний період [148]. Масу тіла щурів вимірювали на лабораторних електронних вагах FEH-300 (AnD, Україна) з 9.00 до 10.00 год щодня. Наявність вегетативних вазомоторних порушень у тварин оцінювали за змінами показника температури тіла самок щурів біля кореня хвоста, що вважають еквівалентом такого клінічного прояву клімактеричного

синдрому у жінок, як приливи жару [147]. Вимірювання температури проводили щодня протягом 28 діб уведення тест-зразків за допомогою електронного термометра (безконтактний інфрачервоний термометр Non-contact DT 8809c Original Pro 32 ºС ~ 42,5 ºС для тіла і поверхонь, Китай).

Мікробіологічне дослідження біотопу піхви самок щурів для визначення потенційної дисбіотичної дії тест-зразків проводили за 24 год до початку лікування і за 24 год після завершення лікування [148, 149]. Стерильними тампонами проводили відбір біологічного матеріалу для дослідження, які вносили у стерильні пробірки з тіогліколевим буферним розчином. Другий етап — розведення (від 10–2 до 10–10) проводили тим самим буфером із використанням нової піпетки для кожного розведення. На спеціальні та диференційно діагностичні поживні середовища наносили приготовлені розчини по 0,1 мл краплинно (методом прямого посіву) для виділення первинної оцінки лактозонегативних та лактозопозитивних паличок (середовище Ендо), бактерій групи аеробів (м'ясо-пептонний агар) та анаеробів (анаеробний агар), стафілококів (сольовий агар), лактобактерій (лактоагар). Кількість мікроорганізмів визначали після інкубації, що виросли на середовищах у відповідних розведеннях. Кількість одиниць колонієутворювальних мікроорганізмів (КУО) обчислювали в 1 мл за формулою: X = Lg (N × 10 × 10n), де: X — логарифм числа КУО в 1 мл; N — кількість колоній, що утворилися на середовищах; 10 — постійний коефіцієнт при посіві 0,1 мл відповідного розведення; n — ступінь розведення.

Морфологічне дослідження слизової оболонки піхви, серця, великогомілкової кістки проводили на мікропрепаратах методом світлової мікроскопії. Зразки біоматеріалу (піхва, серце, великогомілкова кістка) фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (на фосфатному буфері, pH 7,4). З піхви і серця отримували поперечні і поздовжні зрізи 2–3 мм і заливали у парафін (Leica Surgipath Paraplast Regular) через ізопропанол-парафіновий метод [151]. Зразки кісток демінералізували у розчині OsteoFast 2 (BioGnost

Ltd., Хорватія) і через ізопропанол-парафіновий метод заливали і парафін. На мікротомі Thermo Microm HM 360 виготовляли парафінові зрізи і забарвлювали гематоксиліном з еозином, кістки додатково забарвлювали альціановим синім (pH 1,0) [151] для виявлення кислих сульфітованих глікозамінгліканів (із контрзабарвленням пікрофуксином). Морфометричну оцінку проведено у пакеті програми Carl Zeiss (AxioVision SE64 Rel.4.9.1). Для цього мікропрепарати досліджували і фотографували на мікроскопі Olympus BX 51. На мікрофотографіях зі збільшенням об'єктива ×20, ×40, які були одержані з однотипних ділянок досліджуваних зразків, вимірювали лінійні показники: у слизовій оболонці піхви — товщину епітеліальної пластинки, у міокарді серця — діаметр кардіоміоцитів, у великогомілковій кістці — товщину епіфізарного і метафізарного хрящів.

При хірургічному видаленні яєчників найбільшою мірою змінюються рівень статевих гормонів (естрадіолу, прогестерону, тестостерону) [152]. Вміст гормонів у сироватці крові самок щурів проводили імуноферментним методом на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 303 plus (Awareness Technology, США) із застосуванням стандартних наборів реактивів «Естрадіол ІФА» і «Прогестерон ІФА» (ТОВ «ХЕМА», Україна) згідно з інструкціями до наборів.

З метою всебічного вивчення фармакодинаміки тест-зразка лідера подальші дослідження проводили як на моделі хірургічного видалення яєчників, так й на моделі хімічної кастрації самок щурів.

Дослідження нейропротекторний властивостей було виконано на базі навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного під керівництвом д.б.н., професора Беленічева І. Ф. Центр оснащено сучасним науковим обладнанням для проведення різноманітних наукових досліджень де виконуються молекулярно-клітинні, фізико-хімічні, денситометричні, імуноферментні, імуногістогімічні, комп'ютерно-морфометричні, інструментально-функціональні і експериментально-фармакологічні дослідження.

Для моделювання гіпоестрогенії у щурів з інтактними яєчниками використовували синтетичну речовину VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide; 4-вінілциклогексен діепоксид). Модель VCD рекомендують для вивчення порушення опорно-рухового апарату, серцево-судинної системи і ЦНС при періменопаузі та менопаузі [153]. У роботі нами була використана субстанція VCD (виробник Sigma-Aldrich, США), яку розводили рафінованим кукурудзяним маслом і щодня вводили підшкірно самкам щурів тривалістю 15 діб, дозою 60 мг/кг. Ця доза викликае руйнування 80–90 % дрібних преантральних (примордіальних і первинних) фолікул в яєчниках самок щурів, прискорюючи процеси атрезії, тим самим викликаючи передчасний розвиток гіпоестрогенії як аналог періменопаузи/менопаузи у жінок [153]. Через 15 діб після використання VCD упродовж 28 діб інтравагінально уводили гель з Р та ГК (режим монотерапії), вагінальний гель з Р ГК і таблетки з ресвератролом (виробник iHerb, USA), для посилення ефекту фітоестрогенового впливу ресвератролу (режим комбінованої терапії).

На цьому етапі дослідження як референтний препарат було обрано крем Колпотрофін з 1 % вмістом проместрину (П).

Розподіл тварин за експериментальними групами наведено у табл. 2.4

Гель із Р та ГК і крем із П уводили інтравагінально один на добу за допомогою шприца-дозатора з атравматичним наконечником 0,005 мл/кг, таблетки з ресвератролом вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда у вигляді супензії в дозі 100 мг/кг один раз на добу. Тривалість лікування складала 28 днів.

Для дослідження нейропротективної дії вагінального гелю з Р та ГК (режим монотерапії), або у поєднанні вагінального гелю з Р та ГК і внутрішньошлунковому (в/ш) введенні ресвератролу (режим комбінованої терапії) оцінювали їх вплив на експресію факторів ендогенної нейропротекції

(мРНК HSP70, HIF-1, c-fos) для подальшого обґрунтування оптимальної схеми лікування гіпоестрогенових станів, що виникають внаслідок менопаузи.

Таблиця 2.4

Експериментальні групи та умови експерименту

Експериментальна група	Умови експерименту	Доза за лікарською фомою
Інтактний контроль (ІК)	Інтактні тварини	–
Контрольна патологія (КП)	Хімічна кастрація (речовина VCD підшкірно, 60 мг/кг, щодня 15 діб)	Вода для ін'єкцій, гель 0,1 мл/добу
КП + гель з Р та ГК	Хімічна кастрація + 0,5 % гель з Р та ГК і/ваг з 16-ї доби раз на день, протягом 28 днів (режим монотерапії)	Гель 0,1 мл/добу
КП + гель з Р та ГК + таблетки з Р	Хімічна кастрація + 0,5 % гель з Р та ГК і/ваг + Р в/ш з 16-ї доби раз на день, протягом 28 днів (режим комбінованої терапії)	Гель 0,1 мл/добу табл. Р в/шл 100 мг/кг
КП + крем з П	Хімічна кастрація + 1 % крем з проместрином	Крем 0,1 мл/добу

Щурів виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для досліджень брали кров з черевної артерії і головний мозок. З головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової оболонки і досліджувані шматочки мозку поміщали в рідкий азот. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному обсязі середовища при (2 °С), що містить (у ммоль): сахарози — 250, трис-HCl-буфера — 20, ЕДТА — 1 (pH 7,4). При температурі (+4 °С) методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифузі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію. Головний мозок експериментальних тварин поміщали на добу в фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парапласт. Для

проведення полімеразної ланцюгової реакції на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи СА-1 зони гіпокампу завтовшки 5 мікрон.

Характер експресії мРНК HSP70, HIF-1, c-fos визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Тканини депарафінірували шляхом інкубації в двох наступних один за одним ваннах ксилолів та 100 % етанолі. Після депарафінірування та центрифугування осад висушивали на повітрі для видалення залишків етанолу.

Виділення тотальної РНК із тканин щурів проводили з використанням набору Trizol RNA Prep 100 («Ізоген», Росія), який містить реагенти Trizol reagent та ExtraGene E. РНК виділяли відповідно до протоколу набору. Для зворотної транскрипції (синтез до ДНК) використовували «Набір реагентів для проведення зворотної транскрипції (ОТ-1)» («Сінтол», Росія). Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96 ™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) і набір реактивів для проведення ПЛР-РВ в присутності SYBR Green R-402 («Сінтол», Росія). Специфічні пари праймерів (5'–3') для аналізу досліджуваних і референс генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) і виготовлені фірмою «ThermoScientific», США. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично в кінці стадії елонгації кожного циклу по каналу автоматично SybrGreen. Як референс-ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген *Actin, beta* (Actb).

Імуноферментний аналіз. Принцип методу базується на твердофазній ензимпов’язаній імуносорбції, за принципом «сендвіча». Рівень білка теплового шоку HSP70 визначали у цитоплазматичній і мітохондріальній фракції головного мозку імуноферментним методом, використовуючи набір AMP'D® HSP70 (високочутливий тест ELISA kit, Enzo, Швеція). Концентрацію HSP70 розраховували в нг/мл.

Дослідження рухової і пошукової активності тварин проводилося за допомогою методики «відкрите поле» за добу до закінчення експерименту. Використовували арену з розмірами 80 × 80 × 35 см (AgnTho's, Sweden). Тварину поміщали всередину однієї зі сторін мордою до стінки, після чого їй протягом 8 хв дозволяли вільно переміщатися по арені. Оцінювали загальну пройдену відстань (см), загальну рухову активність ($см^2/с$), структуру активності (висока, низька активність, неактивність, %), кількість завмирань і входжень до центру, відстань, пройдену біля стінки (см) і в центральній частині арени (див, %), вертикальну пошукову активність (кількість стійок на задніх лапах біля стінки і в центрі), кількість подій короткого і довгого грумінга, кількість актів дефекації та уринації. Експерименти проводилися в добре освітленій кімнаті в повній тиші. При проведенні експериментів виключався вплив зовнішніх і внутрішніх візуальних, нюхових і слухових стимулів.

Оцінка поведінки тварин проводилася лаборантом, який не обізнаний про приналежність тварини до конкретної експериментальної групи (сліпий метод). Захоплення і запис зображення проводився за допомогою кольорової відеокамери SSC-DC378P (Sony, Japan). Аналіз відеофайлу проводився за допомогою програмного забезпечення Smartv 3.0 (Harvard Apparatus, USA). Статистична обробка результатів проводилася за допомогою MicrosoftExcel 2016 з пакетом статистичної обробки AtteStat 12. Для оцінки достовірності відмінностей в досліджуваних групах використовувався критерій Крускала – Уолліса з поправкою Данна. Вірогідним вважалися відмінності при $p < 0,05$.

У дослідження поведінки тварин в тесті «відкрите поле» були використані показники, які в більш ранніх дослідженнях подібного рівня використовувалися рідко — висока активність та неактивність і їх тривалість. Комп’ютерна програма дозволяла виявити структуру загальної активності — висока активність і неактивність. Зміни в патернах активації в мигдалині, лімбічній зоні, пов’язані зі страхом і тривогою, виявляються між низькою і

високою активністю при проходженні тесту «відкрите поле» і пов'язано з обумовленістю страху. Це пов'язано з рівнем експресії c-fos у мигдалині і лімбічній системи.

Дані представлені у вигляді середнього арифметичного і стандартної похибки середнього значення (M ± m). Результати дослідження оброблені з використанням статистичного пакета ліцензійної програми STATISTICA® для Windows 6.0 (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5), а також Microsoft Excel 2010. Статистичну обробку проводили з застосуванням t-критерію Стьюдента і U-критерію Манна – Уїтні. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності з рівнем значимості менш 0,05 (95 %) [154–157].

При дослідженні гострої токсичності використовували два шляхи введення вагінального гелю — внутрішньошлунковий та інтравагінальний. При і/в уведенні досліджуваний тест-зразок давали по 0,1 мл щогодини впродовж 6 год, що у сумі склало 0,6 мл на тварину (доза 0,005 мл/кг) за лікарською формою. При в/ш уведенні вагінального гелю з Р та ГК вводили у дозі 5000 мг/кг. Термін спостереження за самками щурів складав 14 діб, упродовж якого реєстрували клінічну картину інтоксикації, випадки загибелі, динаміку маси тіла тварин (початкові дані, 3, 7 та 14 доба). Після декапітації самок щурів на 14 добу проводили аутопсію за методом Roe [158], макроскопічно оцінювали стан внутрішніх органів та визначали їх відносну масу.

При тривалому застосуванні (90 діб) вивчали токсичність вагінального гелю на самках щурів, яким і/в раз на добу його уводили у дозі (0,005 мл/кг), що відповідає дозі випробованої в гострому експерименті. Оцінку токсичного впливу гелю з Р та ГК проводили протягом усього досліду та двох тижнів після його закінчення за такими параметрами: виживаність тварин, динаміка маси тіла (1-, 2-, 3- місяці та через 2 тижні після його закінчення). На 14, 30 та 90 добу частину тварин декапітували для вивчення впливу вагінального гелю на стан піхви та яєчників. Визначали масу внутрішніх органів та їх вагові

коефіцієнти. Досліждували морфоструктуру піхви і яєчників, а також проводили морфометричні вимірювання товщини епітеліального шару слизової оболонки піхви.

Статистичну оцінку проведено у програмі Origin Lab version 8.0, методами описової статистики та порівняльних методів аналізу з використанням t-критеріїв Ст'юдента або Ньюмена – Кейлса у разі нормального розподілу, (дисперсійний аналіз ANOVA та критерій Данета, рівень значущості $p < 0,05$), непараметричних методів аналізу (критерій Крускала – Уоліса). Дані наведено у вигляді медіани з квартильним розподілом (Me[Q1-Q3]) або середнього значення та похибки квадратичного відхилення (M±SE) [157]. Фішера — для даних, які не підлягають нормальному закону розподілу [154–157]. Відмінності між групами вважали статистично вірогідними при прийнятому рівні статистичної значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ НОВОГО ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ

3.1 Динаміка маси тіла та вегетативні реакції оваріоектомованих самок щурів під впливом лікування вагінальними гелеми зі ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Дослідженню підлягали тест-зразки вагінальних гелей, що містили такі АФІ, як ресвератрол (0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %), гіалуронову кислоту та допоміжні речовини, зокрема молочну кислоту. Зазначені речовини здатні впливати на вторинні ланки розвитку МС, зокрема на його генітоуринальні прояви. Порівняльний склад тест-зразків вагінальних гелей наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Склад досліджуваних тест-зразків вагінальних гелей

Активні фармацевтичні інгредієнти	Тест-зразки вагінальних гелей				
	Вміст ресвератролу в 100 г гелю				Гінодек (препарат порівняння)
	0,5 %	1 %	2 %	3 %	
Ресвератрол, г	0,5	1,0	2,0	3,0	–
Гіалуронова кислота, г	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Молочна кислота	До pH 4,5	До pH 4,5	До pH 4,5	До pH 4,5	До pH 3,8–4,5
Декаметоксин, г	–	–	–	–	0,02

Як показали дослідження, після хірургічного видалення яєчників відбуваються зміни маси тіла у тварин. Зважаючи на те, що однією з

характерних ознак менопаузального синдрому є порушення ліпідного обміну, що може відігравати вирішальну роль у розвитку цукрового діабету 2 типу та метаболічного синдрому і проявляється збільшенням маси тіла, було досліджено динаміку зміни маси тіла самок щурів в експериментальних групах (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Динаміка маси тіла оваріоектомованих самок щурів до та після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Експериментальна група (n=6)	Маса тіла до ОЕ, г	Маса тіла через 5 тиж. після ОЕ, г	Приріст маси тіла за 5 тиж. після ОЕ, %	Маса тіла через 5 тиж. лікування (9 тиж. після ОЕ), г	Зміна маси тіла за період лікування, %	Приріст маси тіла від початку експерименту, %
ІК	209,67±1,68	216,0±1,15	2,9	224,17±1,49	3,6	6,5
КП	211,33±1,15	235,33± 2,01*	10,2	254,33±2,46*	7,5	16,9
КП + гель з Р 0,5 %	215,17±0,83	234,67± 0,67*#&	8,3	230,67±2,99*#&	–1,7	6,7
КП + гель з Р 1 %	214,33±1,28	234,0± 1,39*#&@	8,6	230,83±1,92*#& @	–1,4	7,2
КП + гель з Р 2 %	213,17±1,19	233,33± 1,94*#&@ ^	8,8	231,33±0,92*#& @^	–0,9	7,9
КП + гель з Р 3 %	214,83±0,95	236,83± 1,80*#&@ ^≈	9,3	233,67±0,42*#& @^≈	–1,4	8,2
КП + гель Гінодек	216,33±1,20	235,83± 1,30*#&@ ^≈§	8,3	241,00±1,61*#& @^≈§	2,1	10,2

Примітки:

* — $p < 0,05$ порівняно з вихідною масою тіла; # — $p < 0,05$ порівняно з ІК; & — $p < 0,05$ порівняно з КП; @ — $p < 0,05$ порівняно з КП + гель з Р 0,5 %; ^ — $p < 0,05$ порівняно з КП + гель з Р 1 %, ≈ — $p < 0,05$ порівняно з КП + гель з Р 2 %; § — $p < 0,05$ порівняно з КП + гель з Р 3 %, $p < 0,05$.

Як видно з наведених у табл. 3.2 даних, у тварин групи інтактного контролю наприкінці 5-го тижня експерименту відзначався незначний приріст маси тіла тварин, який становив 2,9 %. У той же час після моделювання гіпоестрогенового стану маса тіла щурів статистично достовірно збільшувалася на 10,2 %, її приріст перевищував такий у інтактних щурів. Спостереження через 9 тижнів досліду показали, що маса тіла в групі КП достовірно збільшилася (16,9 %) порівняно з тваринами групи ІК, де її приріст становив 6,5 %. У групах КП + гель з Р 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % і в групі КП + гель Гінодек маса тіла тварин була нижчою ($p < 0,05$), ніж маса тварин у групі КП, що свідчить про здатність досліджуваних препаратів уповільнювати зростання маси тіла у самок із гіпоестрогенією.

З початку експерименту на момент первинного зважування й до виведення щурів з експерименту (через 9 тижнів) приріст маси тіла в самок щурів у групі КП + гель з Р 0,5 % був на 10,3 % нижчим, ніж у групі КП і достовірно не відрізнявся від значень групи інтактних тварин.

Підбиваючи підсумки вже на даному етапі дослідження, слід звернути увагу на те, що гель з 0,5 % ресвератролу найефективніше стабілізував масу тіла оваріоектомованих щурів, попереджаючи її зміни на фоні гіпоестрогенії. Після лікування вагінальним гелем Гінодек маса тіла збільшувалася на 10,2 %, що свідчить про меншу ефективність препарату, порівняно з тест-зразками вагінальних гелів з Р зі вмістом діючої речовини 0,5 і 1 %.

3.2 Зміни температури тіла у кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Як показали дослідження, після хірургічного видалення яєчників відбуваються характерні зміни, а саме коливання температури, що є еквівалентом симптому приливів жару в жінок.

До ранніх клімактеричних симптомів також відносять вазомоторні порушення, а саме приливи жару, нічну пітливість, що виникають у жінок внаслідок дефіциту естрогенів [159]. Для спостереження вазомоторних реакцій у тварин вимірювали температуру тіла біля кореня хвоста (аналог симптому приливів жару). Цей показник вимірювали щоденно протягом 4-тижневого періоду лікування (табл. 3.3).

На відміну від інтактних тварин, у яких графік температури тіла впродовж 4 тижнів мав монотонний характер, коливаючись у межах від 32,7 до 32,9 °С, у оваріоектомованих самок відмічено стрибки температури від 34,2 до 36,5 °С на 5-й тиждень і до кінця експерименту. Це свідчить про розвиток вазомоторних реакцій. У тварин групи КП температура тіла хвоста з 5-го тижня та до кінця експерименту була підвищена на 9,8 %. У групах тварин, яким уводили тест-зразки зі вмістом ресвератролу 0,5 %, 1 %, 2 % і 3 % і гелю Гінодек відповідно спостерігалося зниження цього показника. Отримані результати свідчать, що введення тест-зразків нового вагінального гелю з Р і ГК сприяли нормалізації температури біля кореня хвоста, наближаючи цей показник до групи тварин ІК, проте найефективнішим виявився вагінальний гель зі вмістом Р 0,5 %. У разі застосування препарату порівняння Гінодек зміни температурного показника відбувалися, але не значні, вони не досягли показників тварин групи ІК.

Можна припустити, що дія досліджуваних гелів із Р, ймовірно, пов’язана зі здатністю фітоестрогену та синтеричногоо естрогену проместрину впливати на вивільнення гормонів, зокрема ТТГ (тиреотропний гормон) та ЛГ (лютеїнізуючий гормон), які відіграють важливу роль у патогенезі припливів жару [160, 161].

Підбиваючи проміжні підсумки, можна зазначити, що лікування гіпоестрогенового стану, що виникав внаслідок білатеральної оваріоектомії, вагінальним гелем із Р та ГК здатний викликати системні фармакологічні

ефекти, що проявляються зниженням темпів приросту маси тіла та зменшенням вегетативних реакцій (за типом приливів жару) у тварин.

Таблиця 3.3

Зміни температури тіла у кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Експериментальна група (n=6)	Температура тіла щурів до ОЕ, °С	Температура тіла через 5 тиж. після ОЕ, °С	Підвищення температури тіла через 5 тиж. після ОЕ, %	Температура тіла після 4 тиж. лікування (9 тиж. після ОЕ), °С	Підвищення температури тіла за період лікування, %	Підвищення температури тіла від початку експерименту, %
ІК	32,74±0,08	32,83±0,14	0,3	32,92±0,05	0,3	0,6
КП	32,9±0,12	36,05±0,11*#	9,8	36,05±0,28*	0	9,8
КП + гель з Р 0,5 %	32,88±0,14	35,9±0,08*	9,5	33,35±0,10&	7,7	1,4
КП + гель з Р 1 %	32,53±0,17	36,03±0,06*#	11	33,12±0,12&	8	1,8
КП + гель з Р 2 %	32,75±0,18	36,07±0,09*#	10	33,22±0,12&	8	1,5
КП + гель з Р 3 %	32,8±0,18	35,83±0,05*#	9,5	33,77±0,10&	6,2	3,0
КП+ гель Гінодек	32,8±0,18	36,00±0,03*#	8,9	34,8±0,06&	3,5	5,9

Примітка.

* — $p < 0,05$ порівняно з вихідною температурою тіла; # — $p < 0,05$ порівняно з ІК; & — $p < 0,05$ порівняно з КП.

Наявність у вагінального лікарського засобу з фітоестрогеном не тільки місцевої, а й резорбтивної дії потребує більш ретельного дослідження його фармакологічних і токсикологічних властивостей.

3.3 Вплив вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на мікробіоценоз та кислотність вагінального секрету оваріоектомованих самок щурів

Функціональні зміни епітелію слизової оболонки піхви, пов'язані з дефіцитом естрогенів, характеризуються зменшенням кількості та якості вагінального секрету. Зникає поживне середовище для лактобактерій, внаслідок чого збільшується кількість умовно-патогенних мікроорганізмів у піхвовому біоценозі, змінюється показник pH вагінального секрету. Зазначені зміни призводять до патологічної сухості слизової, свербіжу, печіння, болючості, травматизації та розвитку запалення [162]. Тому ми вивчали вплив досліджуваних тест-зразків на показник стану біоценозу нижнього відділу генітального тракту та pH вагінального секрету у самок щурів із гіпоестрогенією.

Внаслідок двосторонньої оваріоектомії у самок щурів у посівах вагінального секрету статистично достовірно збільшувалася кількість умовно-патогенних мікроорганізмів, аеробних бактерій, кишкових паличок, стафілококів, з'являлися клостридії. Встановлено достовірне зниження кількості лактобактерій, тобто відбувалися суттєві зміни, що вказували на суттєві зміни вагінальної мікрофлори (табл. 3.4). Під впливом тест-зразків вагінальних гелей із Р 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % спостерігалося помірне покращення досліджуваних показників вагінального біотопу: зменшення росту умовно-патогенних мікроорганізмів порівняно з тваринами групи КП, кількість лактобактерій була майже на рівні показника групи ІК, а також спостерігався певний вплив на кількість анаеробних мікроорганізмів — клостридій.

Після застосування препарату порівняння Гінодек у самок щурів достовірно зменшувалася кількість умовно-патогенних мікроорганізмів, кишкової палички, стафілококів, клостридій і збільшувалася кількість лактобактерій.

Таблиця 3.4

Показники стану біоценозу нижнього відділу генітального тракту овaріоектомованих самок щурів, яких лікували вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, (КУО/мл, x ± Sx)

Мікро-організми	Експериментальна група, n = 6						
	ІК	КП	КП+ гель з Р 0,5 %	КП + гель з Р 1 %	КП + гель з Р 2 %	КП + гель з Р 3 %	КП + гель Гінодек
Анаеробні бактерії	9,06± 0,08	9,92± 0,29*	9,17± 0,05*#^	9,18± 0,04*#^^	9,23± 0,04*#^	9,42± 0,12*#^	9,06± 0,03*#^
Клостридії	0	6,39± 0,015*	4,72± 0,12*#^	4,82± 0,12*#^	4,74± 0,17*#^	5,74± 0,3*#^	4,57± 0,11*#^
Кишкова паличка	6,87± 0,11	9,86± 0,14*	7,07± 0,20*#^	7,19± 0,25*#^	7,24± 0,26*#^	7,13± 0,33*#^	6,77± 0,14*#^
Інші аеробні грамнегативні бактерії	6,15± 0,07	8,17± 0,06*	6,97± 0,15*#^	7,14± 0,14*#^	7,11± 0,30*#^	7,22± 0,19*#^	6,15± 0,08*#^
Стафілококи	3,20± 0,05	5,20± 0,07*	3,68± 0,28*#^	4,06± 0,20*#^	4,01± 0,13*#^	4,13± 0,23*#^	3,21± 0,04*#^
Лактобактерії	10,05± 0,05	7,76± 0,28*	9,89± 0,14*#^	9,68± 0,21*#^	9,76± 0,18*#^	9,53± 0,14*#^	10,07± 0,07*#^

Примітки: * — $p < 0,05$ порівняно з групою тварин ІК; # — $p < 0,05$ порівняно з групою тварин КП; ^ — $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, які отримували препарат порівняння; n — кількість тварин в експериментальній групі.

Отримані результати свідчать про те, що досліджувані тест-зразки в цілому проявляли менш виражену антимікробну активність, ніж препарат порівняння Гінодек, якій нормалізував вагінальний мікробіоценоз самок щурів із гіпоестрогенією.

За впливом на показники кількості аеробних грамнегативних бактерій, стафілококів і здатністю відновлювати чисельність лактобактерій активність тест-зразка вагінального гелю з Р 0,5 % перевершувала інші тест-зразки.

3.4 Вплив вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на pH вагінального секрету оваріоектомованих самок щурів

Універсальним маркером нормального гормонального статусу генітального тракту є кисле середовище вагінального секрету [163]. Під час менопаузи в жіночому організмі зменшується кількість вироблення жіночих статевих гормонів. Такі гормональні перебудови призводять до змін кількості та характеру секрету, зникає поживне середовище для лактобактерій, внаслідок чого зростає pH вагінального секрету піхви. У цей період рівень pH (у нормі 4,0–4,5) може підвищуватися до 6–7 (утворюючи лужне середовище). Це стало підґрунтям вивчення впливу досліджувальних тест-зразків на показник pH вагінального секрету в самок щурів із гіпоестрогенією.

Перед початком лікування не було відзначено значущої різниці в показниках pH вагінального секрету в самок групи ІК, він був слабко-кислим, що відповідає фізіологічному стану. У тварин групи КП показник pH збільшився з 4,0 до 7,0, тобто кислотність вагінального секрету змінювалася практично до нейтрального показника (додаток А, рис. 3). При гіпофункції яєчників виникає редукція синтезу естрогенів, що відображається стоншенням багатошарового епітелію і зниженням вмісту глікогену; злущені клітини епітелію є поживним субстратом для ферментів життєдіяльності лактобактерій, що утворюють МК. Вона відповідає за формування кислого середовища вагінального секрету [164, 165].

Зміни значень pH вагінального секрету наведено на рис. 3 (додаток А).

Курсове 28-денне лікування оваріоектомованих самок тест-зразками позитивно впливало на функціональний стан слизової оболонки піхви, зокрема вагінальний гель із ресвератролом 0,5 % приводив до відновлення фізіологічного діапазону значень кислотності вагінального секрету (показник pH знижувався до фізіологічних значень, а саме 4,0–4,5. Цей показник статистично достовірно відрізнявся від показника в нелікованих тварин групи

КП. Після лікування оваріоектомованих самок щурів препаратом порівняння також спостерігалася нормалізація pH вагінального секрету, цей показник відповідав даним групи ІК.

Таким чином, вагінальні гелі з Р 0,5 % та 1 % сприяли зниженню та нормалізації pH до показника, який характеризував середовище вагінального секрету як кисле, і не поступалися за даним показником препарату порівняння Гінодек.

3.5 Зміни макро- та мікроскопічного стану генітального тракту оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінальних гелей з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Для оцінки менопаузального генітоуринарного синдрому у клінічній практиці широко використовують індекс вагінального здоров'я [166]. Нами проводилося макроскопічне дослідження присінка вагіни та доступних до огляду нижніх відділів її, що певною мірою відповідає клінічній оцінці місцевих проявів клімактеричного синдрому (табл. 3.5).

В інтактних тварин за сумою показників макроскопічного стану нижнього відділу генітального тракту не виявлено патологічних змін, що відповідало фізіологічній нормі.

Так, тварини, що отримували вагінальний гель з Р 0,5 %, продемонстрували найменшу суму балів (2,0), і цей показник найбільше за інші наближався до даних тварин групи ІК. У разі введення препарату порівняння, мала місце незначна атрофія, й сумарна оцінка 3 бали наближалася до групи ІК, але за окремими показниками поступалася групі здорових тварин і групі з Р 0,5 %.

Враховуючи дані джерел літератури, а також результати наших спостережень, можна зробити припущення, що наявність Р у складі гелів забезпечує естрогеноподібну, протизапальну, антибактеріальну дію за умов

оптимально підібраного вмісту ресвератролу 0,5 %, який не впливає на властивості інших компонентів, що входять до складу вагінального гелю, зокрема МК.

Таблиця 3.5

Інтегральна оцінка макроскопічного стану оваріоектомованих самок щурів, яких лікували вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (у балах), після лікування на 29 добу

Експеримен-тальна група	Стан СОП	Наявність вагінальних виділень	Стан шкірного покриву навколо присінка піхви	pH вагіналь-ного секрету	Сума балів
ІК	0	0	0	0	0 (норма)
КП	2	1	2	2	7 (вищий ступінь атрофії)
КП + гель з Р 0,5 %	1	0	1	0	2 (норма)
КП + гель з Р 1 %	1	1	2	0	4 (помірна атрофія)
КП + гель з Р 2 %	2	1	1	1	5 (помірна атрофія)
КП + гель з Р 3 %	2	1	2	1	6 (виражена атрофія)
КП + Гінодек	1	1	1	0	3 (незначна атрофія)

Примітки: Інтегральна оцінка стану слизової оболонки піхви (СОП):

0–2 балів — норма; 3 бали — незначна атрофія; 4–5 балів — помірна атрофія; 6 балів — виражена атрофія; 7 балів — вищий ступінь атрофії.

З метою об’єктивної морфологічної оцінки лікувальної дії досліджуваних тест-зразків було доцільним дослідити їх вплив на мікро- та макроскопічний стан тканин нижнього відділу генітального тракту самок щурів із гіпоестрогенією.

Гістоструктура вагіни самок групи ІК відповідала видовій нормі, а саме стінка піхви складалася з трьох оболонок: внутрішньої слизової оболонки, середньої м'язової оболонки (власна пластинка слизової — строма) та зовнішньої сполучнотканинної оболонки. Епітеліальна пластинка характеризувалася значною товщиною епітеліальної пластинки (у середньому 200–400 мкм) та складалася з багатошарового незроговілого епітелію з чіткою морфофункціональною диференціацією на базальний, проміжний та поверхневий (функціональний) шари (додаток А, рис. 4). На морфологічному рівні власна пластинка представлена пухкою сполучною тканиною, вростає в епітеліальну пластину у вигляді сосочків, містить поодинокі кровоносні капіляри, фібробласти і макрофаги (особливо на межі з епітеліальною пластинкою). У сполучній тканині реєстрували поодинокі кровоносні судини (гемокапіляри). Морфологічних ознак запального процесу, крововиливів або дистрофічних змін епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви не виявлено. Десквамація епітелію та помірна інфільтрація макрофагів у зразках відповідала фізіологічному стану слизової оболонки [167].

Морфологічна картина в усіх 6 зразках самок групи КП характеризувалася різким зменшенням товщини епітеліальної пластинки (у середньому становило 33,3 мкм). Цей показник був суттєво меншим порівняно з тваринами групи ІК (додаток А, рис. 4; табл. 3.6).

Товщина епітеліальної пластинки була неоднорідною, у деяких ділянках реєстрували поодинокі клітини в стадіях мітозу, але частіше виявляли клітини в стані каріопікнозу, що є цитологічною ознакою їхньї загибелі. Стан сполучної тканини мав деяку варіабельність — від незміненої морфології до збільшення щільності фібробластів. Останнє може бути пов'язано з явищами ремоделювання міжклітинного матриксу на фоні атрофії та поєднаним із початковими запальними процесами (реєстрували появу нейтрофілів, макрофагів та еозинофілів у сполучній тканині). Сосочки власної пластинки були слабко виражені або взагалі відсутні. На основі морфологічних і

морфометричних досліджень зроблено висновок про розвиток атрофічних змін слизової оболонки піхви (головним чином епітеліальної пластинки) після оваріоектомії в усіх досліджених зразках тварин групи КП.

Таблиця 3.6

Морфометрична оцінка стану слизової оболонки піхви оваріоектомованих самок щурів, яких лікували вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, Me [Q1–Q3] (n=6)

Експериментальна група	Товщина епітеліальної пластинки, мкм; Me [Q1–Q3]
ІК	188,4 [161,1 – 242,5]
КП	33,3 [31,9 – 55,2]*
КП + гель із ресвератролом 0,5 %	180,3 [156,6 – 220,3]#
КП + гель із ресвератролом 1 %	178,7 [151,3 – 215,3]#
КП + гель із ресвератролом 2 %	176,7 [149,3 – 213,5]#
КП + гель із ресвератролом 3 %	165,8 [137,6 – 204]#
КП + Гінодек	51,3 [42,2 – 63,3]*

Примітки: * — $p < 0,05$ порівняно з групою тварин ІК; # — $p < 0,05$ порівняно з групою тварин КП.

Таким чином, зменшення кількості ендогенних естрогенів призводило до змін у нижньому відділі генітального тракту самок щурів після оваріоектомії.

За умов курсового введення тест-зразків із ресвератролом 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % спостерігалися ознаки типової естрогеноподібної дії, активація регенеративних процесів, підвищення функціонального стану (секретоутворення) слизової оболонки вагіни.

У зразках епітелій характеризувався відновленням проміжного та функціонального шарів, але останній піддавався кератинізації, чого в інтактних щурів не реєстрували. У просвіті піхви виявлено десквамовані, кератинізовані епітеліоцити. У власній пластинці піхви встановлено часткове відновлення рельєфу сосочків, проте їхні морфологічні ознаки не досягали інтактного

стану. За результатами морфометрії виявлено варіабельність відновлення товщини епітеліальної пластинки (у середньому від 165,8 до 180,3 мкм).

За результатами статистичного аналізу морфометричних даних зроблено висновок щодо відновлення стану епітеліальної пластинки піхви порівняно з нелікованими тваринами. Статистично значущої різниці з показником самок групи ІК не виявлено, але морфофункціональний стан епітеліальної та власної пластинки піхви цих тварин все ще не досягав остаточного відновлення.

Результати дослідження показників дослідної групи, яким уводили гель Гінодек (препарат порівняння), наведено на рис. 4-ж та у табл. 3.6. Гістологічна картина стану слизової оболонки піхви свідчила, про стоншення епітеліальної пластинки порівняно з групою інтактних тварин. Морфофункціональний стан слизової оболонки свідчив про збереження атрофічних змін епітеліальної пластинки (товщина в середньому становила 51,3 мкм), збільшенням шарів епітеліоцитів (відновлення проміжного шару), частковим відновленням рельєфу сосочків власної пластинки. Ці зміни оцінено як не значні прояви регенеративних процесів під дією референтного засобу. Проте, відновлення слизової оболонки до стану інтактних тварин не виявлено в жодному з досліджених зразків. Отже, за даними гістологічного дослідження у препарату Гінодек не виявлено естрогеноподібної дії.

Лікування тест-зразками вагінального гелю з Р більш виражено усувало атрофічні прояви в слизовій піхви, стимулювало відновлені процеси, що наближало стан слизової оболонки вагіни самок до тварин групи ІК [168].

3.6 Вивчення гострої та хронічної токсичності вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

З метою виявлення можливих токсичних ефектів вагінального гелю проводили дослідження та порівнювали з показниками групи інтактного контролю. Під час експерименту застосовували два способи введення:

перший — вагінальний, що передбачено для застосування у клінічній практиці, другий — внутрішньошлунковий, який забезпечує системну дію, що відповідає вимогам наказів МОЗ України [169, 170].

При визначенні гострої токсичності лімітуючим показником з урахуванням шляху введення (для в/ш введення доза складає 5000 мг/кг) є максимальна доза IV класу токсичності згідно з рекомендаціями Державного експертного центру МОЗ України [171].

Протягом всього періоду спостереження за тваринами при внутрішньошлунковому та при вагінальному введеннях тест-зразка ознак інтоксикації та загибелі щурів не реєстрували. Загальний стан і поведінка дослідної групи не відрізнялася від групи інтактного контролю. Дослідні тварини були активними, ознак агресії не спостерігалось. Протягом першої години після введення тест-зразка самки щурів сиділи майже нерухомо та притулялися одна до одної. Через 2–3 год спостерігалися рефлекторна збудливість (рухалися по клітці), вмивання, процеси уринації і дефекації, реакції на звукові подразники, споживання їжі та води, які притаманні цим тваринам, та не відрізняли їх від інтактних.

При дослідженні маси тіла самок щурів (табл. 3.7) показано, що одноразове введення в/ш і вагінально статистично не впливало на показники збільшення чи зменшення маси тіла у порівнянні з інтактною групою тварин.

Таблиця 3.7

Маса тіла щурів при гострому впливі вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (n = 6)

Експериментальна група	Період спостереження, доба	Шлях уведення	
		внутрішньошлунково	вагінально
Інтактний контроль	Вхідна маса тіла, г	214,15±1,82	215,00±2,02
	3	215,33±2,26	215,67±2,01
	7	216,00±2,63	217,5±2,63
	14	217,17±2,33	219,17±2,7

Гель з Р та ГК	Вхідна маса тіла, г	внутрішньошлунково	вагінально
		213,83±1,74	215,67±2,14
	3	215,83±1,8	218,00±1,53
	7	216,5±1,59	220,17±2,52
	14	219,17±2,7	225,33±1,41

Нами не виявлено будь-яких відмінностей між дослідними групами. Приріст маси тіла відповідав фізіологічній нормі.

Після закінчення експерименту (14 діб) тварин виводили з експерименту за правилами біоетики відповідно до норм, проведено розтин тварин та макроскопічний огляд внутрішніх органів досліджувальних тварин.

Після розтину самки щурів при візуальному огляду мали блискучий шерстний (волосяний) покрив, слизові оболонки були без характерних змін — гладенькі та блідо-рожеві.

Лімфовузли без змін, звичайних розмірів. Також печінка, нирки та надниркові залози, статеві залози та яєчники, серце, легені були без патологічних ознак та мали звичайний розмір, колір і форму.

Застосування вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою у порівнянні з групою ІК не призвело до змін показників масових коефіцієнтів внутрішніх органів (табл. 3.8), вони були в межах фізіологічної норми [169].

Таблиця 3.8

Коефіцієнт маси внутрішніх органів самок щурів при вивченні гострої токсичності вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (n=6)

Експериментальна група	Інтактний контроль	Гель + з ресвератролом та гіалуроновою кислотою	
		Шлях уведення	
Органи	–	внутрішньо-шлунково	вагінально
Серце	0,33±0,005	0,32±0,004	0,34±0,01
Легені	0,88±0,01	0,89±0,01	0,85±0,01
Печінка	3,11±0,01	3,09±0,01	3,10±0,01
Надниркові залози	0,03±0,0009	0,03±0,0007	0,030±0007

Нирка ліва	0,32±0,05	0,32±0,004	0,33±0,05
Нирка права	0,33±0,05	0,32±004	0,31±0,003
Тимус	0,22±0,01	0,21±0,01	0,19±0,01
Селезінка	0,5±0,04	0,47±0,01	0,47±0,01
Матка	0,34±0,01	0,35±0,01	0,35±0,01
Яєчник лівий	0,03±0,003	0,02±0,002	0,02±0,001
Яєчник правий	0,03±0,002	0,003±0,002	0,03±0,003

При дослідженні хронічної токсичності, яка тривала 90 діб, і 14 діб після закінчення спостереження за щурами не виявили токсичного впливу гелю з Р та ГК на поведінку і загальний стан експериментальних тварин.

Показники динаміки маси тіла самок щурів, наведені в табл. 3.9, свідчать, що протягом 90 діб у самок щурів, які отримували гель з Р та ГК, відбувалося зниження маси тіла тварин в перші 3 тижні стосовно інтактної групи. Підбиваючи підсумки, можно припустити, що після введення фітоестрогену ресвератролу протягом 3 тижнів проявлялася естрогеноподібна дія на метаболічні процеси в організмі самок щурів.

Таблиця 3.9

Маса тіла самок щурів при тривалому уведенні гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (n = 6)

Період спостереження	Інтактний контроль	Гель + з ресвератролом та гіалуроновою кислотою
Вихідні дані	20,67±1,82	21,33±1,15
1-й тиждень	213,83±1,74	205,33±3,16 [2)]
2-й тиждень	215,0±2,02 [1)]	203,83±1,66 [1) 2)]
3-й тиждень	217,17±2,33 [1)]	203,83±1,25 [1) 2)]
1-й місяць	220,5±1,28 [1)]	222,17±2,33 [1) 2)]
2-й місяць	226,5±0,89 [1)]	231,0±2,46 [1) 2)]
3-й місяць	236,33±1,48 [1)]	233,83±2,73 [1) 2)]
Післядія (14 діб)	246,17±2,79 [1)]	240,33±3,30 [1) 2)]

Примітки: 1 — статистично достовірна різниця з вихідними даними ($p < 0,05$); 2 — статистично достовірна різниця з даними ІК ($p < 0,05$); n — кількість тварин у групі.

При макроскопічному дослідженні внутрішніх органів візуальних патологічних змін не виявлено. Результати, отримані стосовно коефіцієнта маси внутрішніх органів тварин, не відрізнялися від групи ІК та показників з групи гель + Р та ГК і відповідали віковій нормі [169].

При гістологічному дослідженні слизової оболонки піхви у дослідної групи при введенні вагінального гелю не було виявлено патологічних ознак. Морфоструктура піхви, яка є органом-мішенню для естрогенів, не відрізнялася від морфоструктури піхви тварин інтактної групи.

Результати вивчення фармакології безпеки та відсутність місцевоподразнювальної дії були доведені даними морфологічного вивчення стану слизової оболонки вагіни. На рис. 5 додатка А наведено результати спостережень багатошарового епітелію. Товщина епітеліального шару була у межах фізіологічної норми та не відрізнялася від групи самок ІК. Це свідчить про морфологічну цілісність та збереження функціональної активності органа.

У підсумку можна зробити висновки з отриманих паказників, що гель з Р та ГК при гострому введенні двома шляхами — в/ш у дозі 5000 мг/кг (за лікарською формою) та і/ваг введенні у дозі 0,1 мл/добу, по-перше, не викликає загибелі тварин; по-друге, не чинить токсичного впливу на поведінку, споживання їжі та води, загальний стан, динаміку маси тіла тварин; по-третє, не викликає видимих візуальних змін внутрішніх органів тварин, а також не впливає на абсолютну та відносну масу внутрішніх органів самок щурів.

Результати, отримані при дослідженні гострої токсичності гелю з Р та ГК, дозволяють віднести його до нетоксичних речовин, а саме — V класу токсичності за класифікацією К. К. Сидорова [172].

Тривале введення (90 діб) вагінального гелю з Р та ГК у дозі 0,1 мл/добу також не впливало на поведінку та загальний стан дослідних тварин, але викликало зменшення маси тіла щурів порівняно з інтактною групою. Новий вагінальний гель не чинив протидії на органи-мішені — яєчники і піхву. На 90 добу досліду вагінальне введення гелю сприяло збільшенню товщини

епітеліального шару піхви. У період післядії (14 діб) товщина епітеліального шару піхви відповідала фізіологічній нормі.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

За результатами проведеного скринінгового дослідження та вивчення фармакології безпеки можна зробити такі висновки:

1. Запропоновані гелі з Р і ГК виявилися ефективними за умов інтравагінального 28-денного введення оваріоектомованим самкам щурів, оскільки стримували підвищення маси тіла, що виникає на фоні дефіциту естрогенів, нормалізували температуру тіла біля кореня хвоста (попереджаючи прояви приливів жару), сприяли відновленню вагінального біотопу та кислого середовища вагінального секрету, запобігали розвитку атрофічних змін слизової оболонки піхви.

2. За результатами інтегральної оцінки ефективності лікувальної дії вагінальних гелів встановлено, що оптимальний вміст ресвератролу у складі лікарської форми становить 0,5 %, оскільки за переважною більшістю показників на моделі експериментального гіпоестрогенового стану в тварин він виявився найбільш ефективним.

3. Результати вивчення гострої токсичності гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою дозволяють віднести його до V класу токсичності (практично не токсична речовина) за класифікацією К. К. Сидорова. Дані щодо тривалого 90-денного і/в введення свідчать про відстутність загальнотоксичного впливу на тварин та місцевоподразнювальної дії гелю з боку слизової оболонки нижнього відділу генітального тракту.

4. Дані експериментального дослідження свідчать про доцільність розробки та використання вагінальних лікарських форм із фітоестрогеном ресвератролом та гіалуроновою кислотою як альтернативи гормоновмісним препаратам для терапії патологічних гіпоестрогенових станів.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Зайченко, Г. В., Стрига, О. А., Мироненко, О. І., & Іванюк, О. І. (2020). Фармакологічне обґрунтування вибору оптимального складу нового вагінального гелю з ресвератролом і гіалуроновою кислотою. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 14* (6), 397–412. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

2. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., & Іванюк, О. І. (20–21 лютого 2020 р.). Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом на масу тіла оваріоектомованих щурів. *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвячеої пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народження), «Planta + Досягнення та перспективи».* Київ, 231–232. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАГІНАЛЬНОГО ГЕЛЮ З РЕСВЕРАТРОЛОМ ТА ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ НА МОДЕЛІ БІЛАТЕРАЛЬНОЇ ОВАРІОЕКТОМІЇ У ЩУРІВ

4.1 Динаміка маси тіла та вегетативні реакції у оваріоектомованих самок щурів під впливом лікування вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Патологічне збільшення маси тіла в період менопаузи є наслідком дефіциту та дисбалансу естрогенів і гестагенів у крові. Характерним метаболічним проявом менопаузального синдрому є порушення ліпідного обміну, що може відігравати важливу та вирішальну роль у розвитку метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу. При клімактеричному синдромі динаміка маси тіла є непрямим підтвердженням відповідності моделі гіпоестрогенемії та ефективності тест-зразка впливати на цей симптом, який виникає внаслідок дисбалансу стероїдних гормонів у крові в період менопаузи [173]. На початку експерименту всі тварини мали приблизно однакову масу тіла: від 208,67 ± 1,82 г до 218, 00 ± 1,63 г (табл. 4.1).

У групі ІК наприкінці 5 тижня есперименту відзначався незначний приріст маси тіла тварин, який складав 2,6 %. Водночас після моделювання гіпоестрогенового стану маса тіла оваріоектомованих щурів статистично достовірно збільшувалася до 249,67 ± 2,25 г, її приріст перевищував такий у інтактних щурів у середньому на 11,57–14,57 %. Спостереження за оваріоектомованими самками щурів (6–9 тиждень) показало, що маса тіла в групі КП достовірно збільшилася порівняно з ІК, а приріст її становив 5,6 %. У групі КП + гель з Р та ГК та в групі КП + крем з П маса тіла тварин, яких

лікували, була нижчою ($p < 0,05$) за масу тварин у групі КП, а втрати жирової маси тканини складали в середньому 27,84–29,17 г.

Таблиця 4.1

Динаміка змін маси тіла оваріоектомованих самок щурів до та після лікування

Група	Маса щурів до оваріо-ектомії, г	Маса через 5 тижнів після моделювання патології		Маса після 4 тижнів лікування (9 тиждень експерименту)		Приріст маси з початку експери-менту, %
		Абс, г	Приріст, %	Абс, г	Приріст чи зниження, %	
ІК	208,67± 1,82	214,17± 2,18	2,60	217,83± 2,51	1,74	4,55
КП	211,33± 1,15	246,33± 1,19*	14,22	260,17± 1,92*	5,60	23,00
КП + гель з Р та ГК	218,00± 1,63	245,33± 3,16*	11,15	231,00± 2,46*/#	–5,84	5,96
КП + крем з П	217,50± 2,63	249,67± 2,25*	12,90	232,33± 2,67*/#/&	–6,96	6,83

Примітки: * — достовірно відносно групи ІК ($p < 0,05$); # — достовірно відносно групи КП ($p < 0,05$); & — достовірно відносно групи КП + гель з Р та ГК ($p < 0,05$).

З початку експерименту на момент первинного зважування і до виведення щурів з експерименту (9-й тиждень) приріст маси тіла у самок щурів у групі КП + гель з Р та ГК був на 17,04 % нижче, ніж у групі КП і достовірно не відрізнявся від значень препарату порівняння.

Це вказує на те, що при 28-денному курсовому введенні вагінальний гель, який містить фітоестроген ресвератрол, здатний уповільнити та нормалізувати приріст маси тіла у оваріоектомованих самок щурів. При цьому в групі тварин, яким як замісну гормонотерапію вводили крем із П, маса щурів практично наближалася до маси тіла здорових тварин. Як бачимо, жодний з

досліджуваних препаратів не викликав збільшення маси оваріоектомованих щурів. Проте найбільш ефективним засобом для нормалізації надмірної ваги при гіпоестрогенії виявився вагінальний гель із ресвератролом.

4.2 Зміни температури тіла біля кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою

До ранніх клімактеричних симптомів також належать вазомоторні порушення, а саме припливи жару, нічна пітливість [174]. Для виявлення патологічних реакцій, подібних до вазомоторних порушень, у тварин вимірювали температуру шкіри біля корення хвоста протягом 4 тижнів (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Динаміка температури тіла (t^o) біля кореня хвоста оваріоектомованих самок до та після лікування

Група	t^o до оваріо-ектомії, C^0	t^o через 5 тижнів після моделювання патології		t^o після 4 тижнів лікування (9 тиждень експерименту)		Підвищення t^o з початку експеримен-ту, %
		Абс, C^o	↑, %	Абс, C^o	↑ чи ↓, %	
ІК	32,83± 0,14	32,92± 0,05	0,28	32,94± 0,11	0,06	0,34
КП	32,9± 0,12	36,18± 0,05*	9,1	36,15± 0,03*	–0,08	10
КП + гель з Р та ГК	32,8± 0,8	35,67± 0,05*	8,2	33,12± 0,12#	–7,2	1
КП + крем з П	32,75± 0,18	35,52± 0,16*	7,9	33,27± 0,3#	–6,42	1,6

Примітки: * — статистично достовірна різниця з групою ІК ($p < 0,05$);
— статистично достовірна різниця з групою КП ($p < 0,05$).

На відміну від інтактних (здорових) тварин, у яких графік температури шкіри впродовж 4 тижнів мав монотонний характер, коливаючись у межах від 32,70 до 32,94 °С, в оваріоектомованих самок (група КП) відмічено коливання температури до 36,18 °С на 5-й тиждень і до кінця експерименту. Це свідчить про вазомоторні реакції, які кваліфікували як рівнозначні до приливів жару.

У групах оваріоектомованих самок щурів, яким проводили лікування вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою, температура тіла не відрізнялася від норми (t = 33,12 °С), що свідчить про нормалізацію термогеруляції на фоні курсового лікування. Також при введенні крему з проместрином температура коливалась у межах норми (t = 33,27 °С). Цей показник статистично достовірно відрізнявся від значень температури у оваріоектомованих самок щурів із групи КП ($p < 0,05$). Підбиваючи підсумки, можна припустити, що дія фітоестрогенів у досліджувальному гелі з Р та ГК була пов’язана зі здатністю зменшувати вивільнення гормонів, таких як ТТГ (тиреотропний гормон) та ЛГ (лютеїнізуючий гормон), які відіграють ключову роль у патогенезі приливів жару в клімактеричному періоді [175].

Під час менопаузи в жіночому організмі зменшується кількість вироблення жіночих статевих гормонів. Такі гормональні перебудови зменшують кількість секрету, зникає поживне середовище для лактобактерій, внаслідок чого зростає pH вагінального секрету піхви. У цей період жінки відчувають сухість у піхві, подразнення, а рівень pH (у нормі 4,0–4,5) підвищується до 6,5–7,0. Лужне середовище стоншує слизову оболонку піхви, викликає сухість, з’являються мікротріщинки і ймовірність зараження різними інфекціями, що призводить до симптомів атрофічного вагініту та дискомфорту під час статевого контакту, знижується якість життя.

У зв’язку з цим вивчався вплив досліджувального тест-зразка на показник pH вагінального секрету у самок щурів з гіпоестрогенією (додаток В, рис. 6).

Через 5 тижнів після проведеної операції оваріоектомії самки щурів були поділені на групи, між якими перед початком лікування не спостерігалася різниця в показниках pH. При вимірюванні pH вагінальних змивів встановлено, що у самок щурів показник pH збільшився з 4,0 до 7,0, тобто кислотність вагінального секрету зменшувалася (додаток В, рис. 6). При гіпофункції яєчників зменшується синтез естрогенів. Естрогени збільшують вміст глікогену, який активує розростання багатошарового епітелію, а відлущені клітини епітелію є субстратом для ферментів життєдіяльності лактобактерій, які, у свою чергу, утворюють молочну кислоту, що є основним механізмом дії формування кислотності вагінального середовища.

Після лікування кислотність вагінального секрету вимірювали вдруге. Таким чином встановлено, що значення pH вагінального секрету в групах самок щурів зі збереженими й видаленими яєчниками не змінилася, залишилася на відмітках 4,0 і 7,0 відповідно (додаток В, рис. 6).

Курсове 28-денне лікування оваріоектомованих самок вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою позитивно впливало на стан слизової оболонки піхви, зокрема сприяло відновленню фізіологічного діапазону значень кислотності вагінального секрету (показник pH знижувався до фізіологічних значень, а саме 4,37–4,5). Цей показник статистично достовірно відрізнявся від показника у нелікованих тварин КП. Після лікування оваріоектомованих самок щурів кремом із проместрином спостерігалася нормалізація pH вагінального секрету, і цей показник майже відповідав даним групи ІК.

Таким чином, даний досліджувальний вагінальний гель із ресвератролом та гіалуроновою кислотою сприяв зниженню та нормалізації pH до показника, який характеризував середовище вагінального секрету як кисле, і не поступався при цьому препарату порівняння крему з проместрином.

4.3 Вплив вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на гормональний стан оваріоектомованих самок щурів

Найбільш характерні зміни, які спостерігаються після хірургічного видалення яєчників, стосуються рівня статевих гормонів — естрадіолу та прогестерону в крові. Період менопаузи є нормальним фізіологічним процесом та характеризується поступовим зниженням синтезу і секреції статевих стероїдних гормонів. Рівень естрогену і прогестерону після хірургічної кастрації знижується надто швидко, що не дає організму можливості адаптуватися до різкого дисбалансу статевих гормонів, а це може негативно вплинути на всі органи і системи жіночого організму, особливо при дефіциті естрогенів.

Вміст статевих гормонів (естрадіол, прогестерон) у сироватці крові самок щурів визначали імуноферментним методом. Результати ІФА продемонстрували статистично достовірне зниження рівня гормонів на фоні двосторонньої оваріоектомії, а саме: рівня естрадіолу — в 2,0 разу, прогестерону — в 2,8 разу відносно даних тварин групи ІК, що напряму пов’язано з оперативним втручанням і різким зниженням статевих стероїдних гормонів (табл. 4.3).

Курсове вагінальне введення гелю з Р та ГК помірно впливало на рівень статевих гормонів. Вміст естрадіолу в сироватці крові тварин цієї групи хоча і був в 1,5 разу вищим ($p < 0,05$), ніж у самок щурів групи КП, але все ж таки не досягав значень ІК. Спостерігалось аналогічне зростання рівня прогестерону, який у 1,4 разу ($p < 0,05$) перевищував показник у нелікованих оваріоектомованих самок і так само не досягав рівня інтактних тварин. Рівень естрадіолу в сироватці крові самок щурів, які отримували крем з проместрином, майже не відрізнявся від даних тварин інтактної групи, тоді як рівень прогестерону був у 1,5 разу меншим, ніж у самок ІК. Отримані результати свідчать, що жодний препарат не здатний повністю відновити

гормональний фон у сироватці крові експериментальних тварин. Препарат порівняння корегував стан гіпоестрогенемії, але слабко впливав на рівень прогестерону. На особливу увагу заслуговує те, що застосування вагінального гелю з Р та ГК майже нормалізувало рівень естрадіолу та прогестерону порівняно з КП.

Таблиця 4.3

Вміст статевих гормонів у сироватці крові оваріоектомованих самок щурів після лікування на 29 добу, ()

Група	Рівень естрадіолу, пг/мл	Рівень прогестерону, пг/мл
ІК	46,7±0,6	23,3±0,3
КП	23,1±0,3*	8,3±0,2*
КП + гель із Р та ГК	35,5±0,8*/#	12,1±0,3*/#
КП + крем із П	39,5±0,8*/#/&	15,9±0,4*/#/&

Примітки: * — статистично достовірна різниця з даними групи ІК ($p < 0,05$); # — статистично достовірна різниця з даними групи КП ($p < 0,05$); & — статистично достовірна різниця з даними групи КП + гель з Р та ГК ($p < 0,05$).

4.4 Зміни макро- та мікроскопічного стану генітального тракту оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Для оцінки менопаузального генітоуринального синдрому у клінічній практиці широко використовують індекс вагінального здоров'я [176]. Нами було проведене макроскопічне дослідження присінка вагіни та доступних до огляду нижніх відділів вагіни, що певною мірою відповідає клінічній оцінці місцевих проявів клімактеричного синдрому (табл. 4.4).

У тварин групи ІК за сумою показників макроскопічного стану нижнього відділу генітального тракту не виявлено патологічних змін, що відповідало фізіологічній нормі.

Тварини з групи КП за сумою показників отримали найвищу суму балів, що відповідала 7 (вищий ступінь атрофії). За умов введення тест-зразків відбувалися зміни в нижньому відділі генітального тракту. Так, тварини, що отримували вагінальний гель із Р та ГК, продемонстрували суму балів (2,0), і цей показник наближався до даних тварин групи ІК. Показники у разі введення препарату порівняння також наближалися до даних тварин групи ІК. Препарат порівняння за показниками не поступався групі здорових тварин і групі з Р та ГК.

Таблиця 4.4

Інтегральна оцінка макроскопічного стану оваріоектомованих самок щурів, яких лікували вагінальним гелем із ресвератролом та гіалуроновою кислотою (у балах), після лікування на 29 добу

Експеримен-тальна група	Стан СОП	Наявність вагіналь-них виділень	Стан шкірного покриву навколо присінка піхви	pH вагіналь-ного секрету	Сума балів
ІК	0	0	0	0	0
КП	2	1	2	2	7
КП + гель з Р та ГК	1	0	1	0	2
КП + крем з П	1	0	1	0	2

Примітки: Інтегральна оцінка стану слизової оболонки піхви (СОП):

0–2 бали — норма; 3 бали — незначна атрофія; 4–5 балів — помірна атрофія; 6 балів — виражена атрофія; 7 балів — вища ступінь атрофії.

За результатами наших спостережень можна зробити припущення, що наявність Р та ГК у складі гелю забезпечує естрогеноподібну дію за умов оптимально підібраного вмісту ресвератролу 0,5 %, який не зменшує

лікувальні властивості інших компонентів, що входять до складу вагінального гелю, зокрема ГК та МК.

З метою оцінки лікувальної дії було доцільним дослідити вплив гелю з фітоестрогеном на мікроскопічний стан слизової оболонки піхви самок щурів із гіпоестрогенією.

Гістоструктура піхви самок щурів групи ІК відповідала видовій нормі, а саме: стінка піхви складалася з трьох оболонок: внутрішньої, середньої м'язової оболонки (власна пластинка слизової оболонки — строма) та зовнішньої сполучнотканинної оболонки. Епітеліальна пластинка характеризувалася достатньою товщиною епітеліальної пластинки (у середньому 200–400 мкм) та складалася з багатошарового незроговілого епітелію з чіткою морфофункціональною диференціацією на базальний, проміжний та поверхневий шари (додаток В, рис. 7). На морфологічному рівні представлена власна пластинка пухкою сполучною тканиною, яка вростає у епітеліальну пластину у вигляді сосочків. Вона містить поодинокі кровоносні капіляри, фібробласти та макрофаги (особливо на межі з епітеліальною пластинкою). У сполучній тканині реєстрували кровоносні судини (поодинокі гемокапіляри). Морфологічних ознак запального процесу, крововиливів або дистрофічних змін епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви не відмічалося. Десквамація епітелію та помірна інфільтрація макрофагів у зразках відповідала фізіологічному стану слизової оболонки піхви [87].

У всіх шести зразках СОП самок щурів групи КП морфологічна картина характеризувалася різким зменшенням товщини епітеліальної пластинки (у середньому дорівнювала 39,4 мкм). Цей показник був суттєво меншим у порівнянні з тваринами групи ІК (додаток В, рис. 7; табл. 4.5). Товщина епітеліальної пластинки була неоднорідна, в окремих ділянках реєстрували поодинокі клітини на стадії мітозу, але також частіше виявляли клітини у стані каріопікнозу, що є цитологічною ознакою їх загибелі.

Таблиця 4.5

Морфометрична оцінка стану слизової оболонки піхви овариоектомованих самок щурів, (n=6)

Експериментальні групи	Товщина епітеліальної пластинки, мкм; Me [Q1–Q3]
ІК	183,2 [129,9 – 244,6]
КП	39,4 [33,5 – 52,3]*
КП + гель із ресвератролом та гіалуроновою кислотою	173,1 [141,1 – 215,9]#
КП + крем із проместрином	95,4 [75,1– 112,6]#

Примітки: * — достовірно стосовно групи тварин ІК, $p < 0,05$; # — достовірно стосовно групи тварин КП, $p < 0,05$.

Стан сполучної тканини мав деяку відмінність — від незміненої морфології до збільшення щільності фібробластів. Збільшення фібробластів може бути пов'язане з явищами ремоделювання міжклітинного матриксу на фоні атрофічних проявів та поєднаним із початковими запальними процесами (реєстрували появу нейтрофілів, макрофагів та еозинофілів у сполучній тканині). Сосочки власної пластинки були слабко виражені або взагалі відсутні. На основі морфологічних та морфометричних досліджень зроблено висновок про розвиток атрофічних змін слизової оболонки піхви (головним чином епітеліальної пластинки) після овариоектомії в усіх досліджених зразках тварин групи КП.

Таким чином після овариоектомії зменшення кількості ендогенних естрогенів призводило до змін у нижньому відділі генітального тракту самок щурів.

При курсовому уведенні тест-зразка з Р та ГК спостерігалися ознаки типової естрогеноподібної дії, активація регенеративних процесів та підвищення функціонального стану (секретоутворення) епітелію слизової оболонки вагіни.

Епітеліальна вистілка піхви характеризувалася відновленням проміжного і функціонального шару, але останній піддавався кератинізації, чого в інтактних щурів не реєстрували. У просвіті піхви виявлялися десквамовані, кератинізовані епітеліоцити. У власній пластинці піхви встановлено часткове відновлення рельєфу сосочків, проте їх морфологічні ознаки не досягали стану інтактних тварин. У 4-х зразках у пухкій сполучній тканині було зареєстровано рясну інфільтрацію еозинофілами. Це було оцінено як прояв імунної реакції на лікування вагінальним гелем із фітоестрогеном. За результатами морфометрії виявлено відновлення товщини епітеліальної пластинки (у середньому від 173,1 мкм).

Ґрунтуючись на результатах статистичних данних морфометричного аналізу, зроблено висновок про відновлення стану епітеліальної пластинки піхви порівняно з нелікованими тваринами. Статистично значущої різниці з показником самок щурів групи ІК не виявлено, але морфофункціональний стан епітеліальної та власної пластинки піхви самок щурів все ще не досягав остаточного відновлення.

Результати дослідження показників щурів дослідної групи, яким уводили крем з проместрином, наведено на рис. 2-г та у табл. 4.5. Гістологічна картина стану слизової оболонки піхви свідчила, що товщина епітеліальної пластинки була стоншеною у порівнянні з групою інтактних тварин. Морфофункціональний стан слизової оболонки піхви самок свідчив про збереження атрофічних змін епітеліальної пластинки (товщина в середньому становила 95,4 мкм), збільшення шарів епітеліоцитів (відновлення проміжного шару), часткове відновлення рельєфу сосочків власної пластинки. Такі зміни оцінено як незначні прояви регенеративних процесів під дією референтного засобу. Проте відновлення слизової оболонки до стану інтактних тварин не виявлено в жодному з досліджених зразків.

Лікування тест-зразком вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою більш виражено усувало атрофічні прояви в слизовій

оболонці піхви, стимулювало відновні процеси, що наближало стан слизової оболонки вагіни самок до тварин групи ІК.

Отримані результати показали доцільність подальшого вивчення фармакологічних властивостей нового вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою як альтернативи гормоновмісним препаратам, для профілактики або лікування патологічних гіпоестрогенових станів, що виникають на фоні дефіциту естрогенів. А підтримка балансу статевих гормонів у жінок у менопаузальному періоді і адекватна терапія, зокрема фітоестрогенами, можуть знижувати розвиток небажаних наслідків у менопаузальному періоді [177].

4.5 Морфологічний стан серцево-судинної системи оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Клімактеричний період у жінок супроводжується фізіологічними змінами різних систем і органів, які пов’язані з гіпоестрогеновим станом. що обумовлено припиненням функції яєчників. До пізніх тяжких його проявів належить менопаузальний метаболічний синдром, який пов’язаний з атеросклерозом, артеріальною гіпертензією, розвитком неврологічних порушень, зокрема когнітивних розладів. Патогенез серцево-судинних захворювань у період менопаузи пов’язаний з тим, що дефіцит естрогенів активує ренін-ангіотензін-альдостеронову систему, сприяючи викиду судинозвужувального пептиду ендотеліну. При цьому відбувається підвищення артеріального тиску з подальшим розвитком гіпертензії або ішемічної хвороби серця у 58 % жінок [179].

Нами було досліджено структурні зміни серця на фоні оваріоектомії при застосуванні нового вагінального гелю з Р та ГК.

При гістологічному дослідженні серця вивчали зміни морфології епі-, міо- та ендокарда передсердь і шлуночків. Загально морфологічна організація камер серця в усіх дослідних групах була збереженою, проте виявлено деякі структурні зміни на рівні міокарда та епікарда. Так, у групі щурів інтактного контролю кардіоміоцити шлуночка формували м'язові волокна, які щільно контактували між собою, в цитоплазмі клітин була наявна поперечна посмугованість і ядра, між волокнами локалізовані поодинокі гемокапіляри. На відміну від цього, у дослідних групах встановлено суттєве збільшення інтерстиційного простору між м'язовими волокнами, а у групі КП мало місце зменшення діаметра (товщини) кардіоміоцитів. При цьому у дослідних групах реєстрували поперечну посмугованість кардіоміоцитів. Ці зміни є свідченням атрофічних змін кардіоміоцитів на фоні оваріоектомії. Іншим проявом морфофункціональних змін міокарда було різке кровонаповнення кровоносних мікросудин, головним чином гемокапілярів (додаток В, рис. 8).

При дослідженні гістологічної будови міокарда передсердь також виявлено деякі відмінності. По-перше, у інтактних щурів морфологія міокарда передсердь відрізняється від такої у шлуночках серця, м'язові волокна мають деяку звивистість і менший діаметр, що знайшло своє відображення у морфометричних показниках (подібну відмінність виявлено в усіх дослідних групах). По-друге, у дослідних групах встановлено зменшення діаметра м'язових волокон, а у двох зразках групи КП фокальні дистрофічні зміни (пошкодження кардіоміоцитів, збільшення інтеґрстиційного простору) (додаток В, рис. 9). Такі зміни поєднувалися зі структурними змінами епікарда (збільшення товщини за рахунок пошкодження та розволокнення), що впливало на появу лімфоцитів або мастоцитів у ділянках (скупчення лімфоцитів, мастоцитів виявлено у групі КП). Суттєвих морфологічних відмінностей між порівнюваними зразками у межах однієї дослідної групи та між групами порівняння не виявлено, лише відмічено меншу кількість стазованих гемокапілярів у групі КП + гель з Р та ГК. За даними

морфометричного аналізу несуттєве покращення встановлено на рівні передсердь. Статистично значуща різниця за показником змін діаметра кардіоміоцитів може вказувати на тенденцію до меншого пошкодження у групах КП + гель з Р та ГК.

4.6 Морфологія кісткової тканини оваріоектомованих самок щурів під впливом вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою

Для дослідження морфофункціональних змін кісткової і хрящової тканини трубчастих кісток на фоні оваріоектомії в інтактних та дослідних груп тварин було відібрано колінний суглоб і проведене гістологічне дослідження дистального епіфіза великогомілкової кістки. У групі інтактних тварин реєстрували всі основні морфофункціональні зони епіфіза кістки, а саме епіфізарний хрящ, субепіфізарну кісткову тканину та метафізарний хрящ. Епіфізарний хрящ представлений гіалінових хрящем зі структурно збереженими зонами (поверхневий шар, перехідний шар, глибокий шар і кальцинований шар) (додаток В, рис. 10). У перехідному і глибокому шарі чітко реєструються інтактні лакуни з хондроцитами. Субепіфізарна трабекулярна кістка містила лакуни з осередками червоного кісткового мозку без ознак резорбції кісткової тканини. У трабекулах реєструвалися кісткові пластинки та остеоцити.

У дослідних групах з оваріоектомією виявлено аналогічну структурну організацію епіфізарного хряща та субхондральної кістки. У групах КП, КП + гель з Р та ГК, КП + крем з П гіаліновий хрящ суглобової поверхні епіфіза великогомілкової кістки було також виявлено окремі морфофункціональні зони без явних морфологічних ознак дегенерації хрящової тканини. Лакуни ізогенних груп містили хондроцити (перехідний шар і глибокий шар), межа кальцинованого шару і субхондральної кістки суттєво не відрізнялась від

контрольної групи (додаток В, рис. 11). У трабекулярній кістці також реєстрували лакуни зі збережених кістковим мозком і судинами, а у самих трабекулах чітко прослідковували окремі кісткові пластинки та остеоцити у власних лакунах. За результатами гістологічних досліджень різниці між групами порівняння на рівні епіфізарного хряща не встановлено. Додатковий аналіз середньої товщини епіфізарного хряща у порівнюваних групах також не показав статистично значущої різниці (додаток В, рис. 12). Ці результати вказують на те, що на 35 добу після оваріоектомії у хрящовій тканині суглобової поверхні та субхондральній трабекулярній кістці ще не відбувалося дегенеративних змін.

Водночас на рівні дистального метафазу великогомілкової кістки було встановлено деякі відмінності у дослідних групах. При аналізі метафізарного хряща інтактної групи щурів також виявлено окремі морфофункціональні зони: зона незмінених ізогенних груп, зона проліферації, гіпертрофії та дегенерації хряща. У глибоких шарах метафізарного хряща (зона гіпертрофії та дегенерації) відбувалася фізіологічна редукція ізогенних груп хондроцитів з подальшою осифікацією хондромукоїду й утворенням трабекулярної кістки (додаток В, рис. 12).

У дослідних групах з оваріоектомією (у групах КП, КП + гель з Р та ГК, КП + крем з П) основні морфофункціональні зони метафізарної пластинки також були наявні (додаток В, рис. 12: 1–4), хоча додатково виявлено фокальні осередки редукції ізогенних груп у зоні проліферації і гіпертрофії хряща, а у зоні дегенерації додаткові ділянки руйнування хондромукоїду з появою лакун (порожніх або з судинами та ретикулярною тканиною). Більш чітко зміни хрящової пластинки виявлено при забарвленні мікропрепаратів альциановим синім, що дозволяло специфічно виявити кислі сульфітовані глікозаміноглікани хондромукоїду (додаток В, рис. 11: 1–40). Структурно це проявлялося зменшенням інтенсивності забарвлення хондромукоїду, редукцією хондроцитів зі зміною контура зони дегенерації і метафізарної кістки у бік

епіфіза. Це вказувало на те, що на 35 добу після оваріоектомії у гіаліновому хрящі метафізарної пластинки відбуваються патологічні зміни зі зниженням синтезу кислих глікозамінгліканів і фокальною редукцією ізогенних груп хондроцитів внаслідок їх дегенерації. Ці зміни є морфологічним проявом ініціальних дегенеративних змін хряща епіфіза великогомілкової кістки, що виникають на рівні метафізарної пластинки на фоні гіпоестрогенії.

Отже, уведення вагінального гелю з Р та ГК і місцева терапія проместрином однаково стримували розвиток специфічних для естрогендефіцитного стану змін з боку серцевого м'яза, хрящової та кісткової тканин.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Поглиблене вивчення ефективності гелю із ресвератролом та гіалуроновою кислотою на моделі білатеральної оваріоектомії у щурів при 28-денному курсовому введенні дозволило встановити, що навіть за умов вагінального уведення гель здатний уповільнити приріст маси тіла, зменшувати виразність симптому приливів жару, нормалізувати показник pH вагінального секрету тварин до фізіологічних значень, не поступаючись при цьому препарату порівняння, крему з проместрином.
2. Лікування вагінальним гелем з ресвератролом та гіалуроновою кислотою сприяло збільшенню рівня статевих гормонів (естрадіолу і прогестерону), виражено усувало атрофічні та вторинні запальні прояви в слизовій оболонці піхви, сприяло відновленню епітеліального шару, що наближало стан слизової оболонки вагіни самок до показника тварин групи інтактного контролю.
3. Вагінальний гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за умов 28 денного лікування оваріоектамованих самок щурів і місцева терапія проместрином однаково стримували розвиток специфічних для

естрогендефіцитного стану змін з боку серцевого м’яза, хрящової та кісткової тканин, що свідчить про здатність до органопротективної дії фітоестрогену і синтетичного естрогену при місцевому застосуванні.

4. Комплекс проведених досліджень вагінального гелю на моделі жорсткого дефіциту естрогенів, викликаного білатеральною оваріоекторією, дозволив виявити не тільки місцеву, а й ознаки системної фармакологічної дії у топічної лікарської форми ресвератролу з гіалуроновою кислотою, що потребує додаткового вивчення.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., Савосько, С. І., & Сорокопуд, К. Ю. (2021). Дослідження фармакологічних властивостей вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою в умовах експериментального гіпоестрогенового стану у щурів. *Медична наука України, 17*(1), 61–69. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

2. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., Савченко, Н. В., & Савосько, С. І. (25 листопада 2020 р.). Морфологічна оцінка ефективності вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою при експериментальному гіпоестрогеновому стані. *Матеріали XIII Міжнародної науково-методичної інтернет-конференції «Сучасні концепції викладання природничих дисциплін у медичних освітніх закладах».* Харків, 151–152. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці тез до друку).*

РОЗДІЛ 5
ВПЛИВ МОНОТЕРАПІЇ ТА КОМБІНАЦІЇ ТОПІЧНОГО І СИСТЕМНОГО УВЕДЕННЯ РЕСВЕРАТРОЛУ НА ПОКАЗНИКИ ЕНДОГЕННОЇ НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЦНС НА МОДЕЛІ ХІМІЧНОЇ КАСТРАЦІЇ У ЩУРІВ

5.1 Характер експресії маркерів ендогенної нейропротекції після курсового лікування гелем та таблетками з ревератролом

Для моделювання гіпоестрогенемії у щурів з інтактними яєчниками використовували хімічну речовину VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide; 4-вінілциклогексен діепоксид). Модель VCD рекомендована для вивчення порушень опорно-рухового апарату, серцево-судинної системи і ЦНС, що ідентичні таким при менопаузі. Уведення VCD, як відомо з даних зарубіжних дослідників, призводить до значного дефіциту прогестерону, а також до зниження естрадіолу на фоні вираженого підвищення ФСГ [180]. Естрадіол і особливо прогестерон відіграють важливу роль у механізмах ендогенної цито- і нейропротекції, регулюють процеси навчання, запам’ятовування, психо-емоційну поведінку [181].

На даному етапі дослідження, через 15 діб після введення VCD для моделювання гіпоестрогенемії, упродовж 28 діб двом групам тварин інтравагінально уводили вагінальний гель з Р та ГК (монотерапія) або вагінальний гель з Р та ГК і таблетки з ресвератролом (комбінована терапія) та крем із проместрином (П) як препарат порівняння. Метою нашого експерименту було виявлення можливого лікувального впливу препаратів ресвератролу на ЦНС при дефіциті естрогенів, вивчення механізмів, за рахунок яких ресвератрол може виявляти нейропротективний вплив за умов, максимально наближених до розвитку фізіологічної менопаузи, а також

доповнення існуючих уявлень про шляхи фармакологічної нейропротекції, що описані дослідниками на іших моделях патології в експерименті (хвороба Альцгеймера, післятравматичне та ішемічне ураження мозку, діабетична нейропатія, хвороба Паркінсона тощо).

Аналізуючи дані, представлені в табл. 5.1 і 5.2, що характеризують експресію HIF-1α, мРНК HSP70 и мРНК c-fos в CA1-зоні гіпокампу головного мозку самок з VCD-гіпоестрогенемією, було встановлено наступне.

Таблиця 5.1

Характер експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos у головному мозку самок щурів з гіпоестрогенемією на 29 добу після лікування (M ± m)

Експериментальна група	мРНК HIF-1α, ум. од.	мРНК HSP70, ум. од.	мРНК c-fos, ум. од.
Інтактний контроль (ІК)	1,000±0,00211	1.000±0,00166	1.000±0,00830
Контрольна патологія (КП)	0,07790±0,00024	0,0744±0,00011	0,19345±0,00690
КП + гель з Р	0,19447±0,01022*	0,09895±0,00029*	0,57921±0,00192*
КП + гель з Р і таблетки з Р	1,82738±0,00486*[1,2]	2,36338±0,00121*[1,2]	1,30514±0,03465*[1,2]
КП + крем з П	0,08337±0,00382	0,06123±0,00012	0,24084±0,03892

Примітки: * – p < 0,05 стосовно тварин групи контрольної патології; 1 — p < 0,05 стосовно тварин групи КП + крем із П; 2 — p < 0,05 стосовно тварин групи КП + гель із ресвератролом.

Експресія мРНК HIF-1α в групі нелікованих щурів (група КП) була на 92,2 % нижче в порівнянні з групою самок інтактного контролю. Також було зареєстровано зниження експресії мРНК HSP70 на 92,5 % і мРНК c-fos на 80,6 %. Імуноферментним аналізом було встановлено зниження вмісту HSP70 у мітохондріях на 61 % і цитозолі головного мозку з VCD-індукованою

гіпоестрогенемією порівняно зі здоровими самками аналогічного віку. Виявлені факти свідчать про пригнічення транскрипційних процесів у нейронах і редукцію HSP70-залежних механізмів ендогенної нейропротекції.

Курсове лікування вагінальним кремом із П достовірно не впливало на експресію мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos, а також на концентрацію HSP70 в головном мозку самок з VCD-гіпоестрогенемією. На віміну від дії синтетичного естрогену, курсове введення вагінального гелю, що містить Р та ГК, самкам щурів із гіпоестрогенемією приводило до достовірного підвищення на 150 % експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 — на 33 % і на 200 % — мРНК c-fos у CA1 гіпокампі.

Таблиця 5.2

Вміст HSP70 у цитоплазмі і мітохондріях головного мозку самок щурів із гіпоестрогенемією на 29 добу після лікування (M ± m), (n=6)

Експериментальна група	HSP70 , пг/мл фракції	
	Мітохондріальна фракція	Цитозольна фракція
Інтактний контроль (ІК)	1,340±0,099	3,589±0,051
Контрольна патологія (КП)	0,512± 0,013	1,292±0,052
КП + гель з Р	0,608±0,016	1,548±0,027*
КП + гель з Р + таблетки з Р	1,268±0,039*[1,2]	2,821±0,031*[1,2]
КП + крем з П	0,544±0,019	1,517±0,071

Примітки: * — $p < 0,05$ стосовно тварин групи контрольної патології; 1 — $p < 0,05$ стосовно тварин групи КП + крем із П; 2 — $p < 0,05$ стосовно тварин групи КП + гель із ресвератролом.

Введення вагінального гелю з Р та ГК також приводило до не значного підвищення концентрації HSP70 на 20 % у цитозольних фракціях головного мозку самок щурів із гіпоестрогенемією. Курсове комбіноване застосування гелю і таблеток із ревератролом призводило до достовірного підвищення експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 та мРНК c-fos у СА1 гіпокампі самок із гіпоестрогенімією в 23 рази, у 30,7 разу і 6,7 разу відповідно, наводячи ці показники до значень ІК або підвищуючи їх в 2,3 разу (мРНК HSP70).

Комбіноване введення вагінального гелю і таблеток із ревератролом самкам щурів із VCD-гіпоестрогенемією достовірно збільшувало концентрацію HSP70 у цитозольних і мітохондріальних фракціях головного мозку на 118 і 177 % відповідно. За ступенем впливу на досліджувальні показники комбіноване введення гелю і таблеток із ревератролом достовірно перевершувало монотерапію гелю з Р і крему з П.

Відомо, що в ініціації механізмів ендогенної нейропротекції певну роль відіграють фактори транскрипції (c-fos і c-jun), які запускають експресію генів білків теплового шоку (HSP70 і HSP72), а також фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1). C-fos відіграють вирішальну роль у контролі над клітинним циклом, розвитком, ростом і клітинним диференціюванням, а також визначають долю диференційованих нейронів, беруть участь у переданні інформації від клітини до клітини. При зриві адаптаційних можливостей організму, різкому збільшенні АФК і дефіциті відновлених тіолів відбувається інактивація факторів транскрипції з подальшим пригніченням експресії генів c-fos [182]. Виявлене зниження експресії мРНК HSP70 і вмісту HSP70 у головному мозку щурів із гіпоестрогенемією може бути обумовлено як дефіцитом прогестерону, так і дефіцитом глутатіону.

Характерним клітинним проявом ішемії є агрегація і накопичення денатурованих білків, активація вільнорадикальних процесів і кальцієве перевантаження. HSP70 можуть обмежувати накопичення денатурованих білків, активацію вільнорадикальних процесів, підвищуючи потужність

антиоксидантних ферментів і обмежуючи ушкоджені ефекти кальцієвого перевантаження за рахунок зв'язування рецептора кальцію — кальмодуліну, а також обмежуючи експресію iNOS [183]. Було показано здатність HSP70 пролонгувати час життя основного адаптаційного фактора — HIF-1, який в екстремальних умовах ініціює запуск компенсаторних механізмів вироблення енергії [184].

Отже, експериментальна гіпоестрогенемія призводить до вираженої депривації механізмів ендогенної нейропротекції, пов'язаних із HSP70. Пероральне введення ресвератролу (у лікарській формі системної дії, що забезпечує більш високу біодоступність ресвератролу) може суттєвим чином покращити перебіг менопаузальних проявів естрогенового дефіциту.

5.2 Вплив вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на функціональний стан центральної нервової системи оваріектомованих самок щурів

Психоемоціональні стани відіграють важливу, а інколи й домінуючу роль [185, 187] у симптоматиці клімактеричного синдрому, який характеризується повним припиненням функції яєчників і дисбалансом стероїдних гормонів [186]. До психічних проявів належать підвищена збудливість, депресія, тривожність, порушення сну та ін. При віковому старінні, тобто фізіологічній менопаузі, змінюється емоційний стан, зростає тривожність, погіршуються когнитивні функції на фоні зниження адаптивного потенціалу організму у жінок [188, 189]. Проте, ці зміни виникають поступово, оскільки дефіцит статевих гормонів виникає протягом декількох років, без різких коливань. Не можна виключити посилення порушень психо-емоційного стану на фоні прогресування генітоуринального симптомокомплексу, зокрема, вагінальної сухості, свербіжу, нетримання сечі, дизурічних розладів, диспареунії.

Своєчасна корекція зазначених проявів естрогенового дефіциту покращує психо-емоційний стан,

Нами було досліджено вплив вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на функціональний стан центральної нервової системи, перш за все на поведінкові реакції самок щурів, на моделі хімічної кастрації, що в більшому ступені відповідає віковим фізіологічним змінам у жінок.

Для дослідження стану тривожності, а саме визначення рухової і пошукової активності використовували тест «відкрите поле». Фіксували поведінкові реакції у самок щурів з гіпоестрогенією після курсового вагінального та перорального уведеня ресвератролу, а також препарату порівняння з проместрином (таб. 5.3).

Таблиця 5.3

Показники поведінки та емоційні реакції в тесті «відкрите поле» в самок щурів з гіпоестрогенією після курсового введення ресвератролу (моно- та комбінована терапія), (n=6)

Експериментальна група / Показники	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Контрольна патологія + гель з Р та ГК	Контрольна патологія + гель з Р та ГК + таблетки з Р	Контрольна патологія + крем з П
Відстань, см	4130,8± 287,1	4831,9± 636,0	3091,4± 198,0*	3921,3± 562,0*[1,2]	3900,7± 1026,1
Вільна відстань, см	59,09± 24,0	529,9± 176,3	310,2± 58,6*	224,9± 72,5*[1,2]	331,9± 33,8
Завмирання	283,5± 33,1	682,1± 22,9	194,8± 28,1*	294,1± 23,6*[1,2]	340,2± 39,4
Вільна відстань, %	1,5±0,6	11,3±2,1	9,7±1,4	7,7±2,1	9,0±0,9
Відстань біля стіни, см	4158,4± 281,9	3219,6± 501,9	3613,8± 513	3951,5± 239,8*[1,2]	3733,9± 1012,7
Стойки біля стіни, од.	4	1	2*	3*[1,2]	3
Дефекація, од.	2	5	2*	1*[1,2]	3
Сечовипускання, од.	1	3	2*	1*[1,2]	2

Примітки: * – $p < 0,05$ стосовно тварин групи контрольної патології; 1 — $p < 0,05$ стосовно тварин групи КП + крем із П; 2— $p < 0,05$ стосовно тварин групи КП + гель із ресвератролом.

Як продемонстровано у табл. 5.3, на фоні оваріоектомії у тварин групи КП збільшувалася тривожність та знижувалася рухова активність порівняно з групою інтактних тварин. Також у групі КП збільшувалися показники вегетативно-емоційних реакцій (дефекації та уринації).

Курсове введення гелю з Р та ГК оваріоектомованим самкам щурів сприяло нормалізації досліджуваних показників орієнтовно-дослідницької активності та зменшенню показників вегетативно-емоційних реакцій, що майже досягали рівня групи інтактних тварин.

Але за всіма досліджувальними показниками комбінована терапія ресвератролом, при психоемоційних порушеннях продемонструвала найбільш виражений антидепресивний ефект, який повністю усував у тварин прояви депресії та досягав показників ІК.

Введення крему з П також сприяло поліпшенню рухової активності експериментальних тварин. Під впливом препарату порівняння зростала дослідна активність у порівнянні з групою КП, досягали показників ІК.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5

1. Встановлено, що на моделі гіпоестрогенемії у самок щурів, викликаної 15-добовим введенням VCD (модель фармакологічної або хімічної кастрації) у структурах центральної нервової системи виникають патологічні зміни, що .

2. Курсове 28-добове лікування самок із гіпоестрогенемією вагінальним гелем з ресвератролом та гіалуроновою кислотою (в монотерапії) приводило до достовірного підвищення на 150 % експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 — на 33 % і на 200 % — мРНК c-fos у СА1 гіпокампі, проте комбінована терапія гелем і таблетками з ресвератролом була більш ефективною. Отже,

нейропротективна дія проявляється тільки у лікарських форм, що забезпечують високу біодоступність ресвератролу та не виявлялася у препарату порівняння, вагінального крему з естрогеном проместрином.

3. У механізмі дії ресвератролу лежить його здатність активувати HSP70-механізми ендогенної нейропротекції при дефіциті естрогенів, а саме підвищувати експресію мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 та мРНК c-fos.

4. Курсове введення гелю з Р та ГК в монотерапії та у комбінації з таблетками ресвератролу самкам щурів з гіпоестрогенією сприяло нормалізації функціонального стану ЦНС, зокрема покращувало орієнтовно-дослідницьку активність, зменшувало прояви вегетативно-емоційних реакцій, що можна розцінювати як наявність ознак антидепресивної дії у ресвератрола. Комбінована терапія виявилася більш ефективною, ніж монотерапія гелем.

5. Отримані результати підтверджують доцільність поєднання вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою з препаратами ресвератролу системної дії для більш ефективної профілактики функціональних розладів ЦНС (початкових когнитивних порушень, депресивних розладів), що виникають на фоні дефіциту естрогенів.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Zaychenko, G. V., Stryga, O. A., Belenichev, I. F., & Sorokopud, K. Y. (2021). Influence of Different Resveratrol Dosage Forms on Indicators of Endogenous Neuroprotection in Experimental Hypoestrogenic State. *Biological Markers and Guided Therapy*, Vol. 8, N 1, 1–11. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).*

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Демографічні зміни, що сталися у другій половині XX ст., призвели до збільшення в популяції питомої частки жінок старшої вікової групи. Щороку зростає кількість жінок, які вступають у період менопаузи. За даними ВООЗ, нині 10 % усього населення земної кулі становлять жінки в клімактеричному періоді. Це пов'язано зі збільшенням тривалості життя та раннім настанням менопаузи. Сучасна жінка понад третину свого життя знаходиться в стані дефіциту жіночих статевих гормонів, тому питання збереження якості життя, соціальної активності, працездатності, інтелектуальних та професійних можливостей, за умов підвищення пенсійного віку, становлять актуальну проблему сучасної медицини [190].

Зважаючи на те, що клімактерій не є захворюваннням, а проявом вікових змін, він призводить до порушення ендокринного балансу в організмі, а це обумовлює розвиток таких симптомів, як припливи, роздратованість, порушення сну, генітоуринальних розладів, а також підвищує ризик виникнення метаболічних, серцево-судинних, неврологічних захворювань, остеопорозу. При настанні природньої менопаузи рівень естрогенів знижується поступово протягом декількох років, а організм жінок адаптується до життя в умовах нестачі естрогенів. При хірургічній менопаузі у 75–90 % жінок протягом кількох днів після операції розвивається синдром постоваріоектомії і стрімко розгортається клінічна картина зростаючого дефіциту статевих гормонів [191]. Вищезазначене обґрунтовує необхідність впровадження медико-соціальних заходів щодо захисту здоров'я, збереження працездатності і належної якості життя жінок у пери- та постменопаузальному періодах, а розробка ефективних і безпечних лікарських засобів для персоніфікованої профілактики та лікування клімактерічних розладів залишається важливим та не до кінця вирішеним завданням сучасної фармакології і фармації.

Зважаючи на те, що «золотим стандартом» фармакологічної корекції симптомів патологічного клімаксу вважається замісна менопаузальна терапія з використанням монокомпонентних або комбінованих препаратів статевих гормонів, на жаль 30–40 % жінок у розвинутих країнах та лише 2–3 % жінок в Україні отримують МГТ [192]. Це пов'язано з наявністю протипоказань, розвитком побічних реакцій, гормонофобією або необізнаністю про переваги МГТ значної частини тих, хто її потребує. Отже, зберігається нагальна потреба у альтернативних лікарських засобах, зокрема негормонального походження для своєчасної корекції менопаузальних розладів.

Останнім часом увагу дослідників привертають фітоестрогени, а серед них — ресвератрол. Це поліфенол, який синтезується в рослинах, міститься в численних продуктах харчування, таких як чорниця і арахіс, а також у винограді і продуктах з нього, таких як червоне вино. Числені публікації, огляди та дані клінічних досліджень свідчать про значний терапевтичний потенціал ресвератролу.

Результати експериментальних досліджень показали, що ресвератрол може бути корисним для лікування широкого кола патологій, включаючи серцево-судинні захворювання, цукровий діабет, ожиріння, рак, захворювання печінки, хворобу Альцгеймера і Паркінсона. Значна кількість досліджень демонструють ефективність ресвератролу при клімактерічних розладах. Він входить до складу лікарських засобів та значної кількості дієтичних добавок, проте, враховуючи той факт, що він не потребує метаболічних перетворень і може виявляти фармакологічну дію як фітоестроген, в тому числі у лікарських формах місцевої дії. До цього часу жодного лікарського засобу у вагінальній лікарській формі не існувало.

Разом із науковцями технологами Національного фармацевтичного університету (проф. Ярних Т. Г., проф. Рубан О. А., ас. О. І. Іванюк) було проведено теоретичне та експериментальне обґрунтування складу нового вагінального гелю з фітоестрогеном ресвератролом для лікування

гіпоестрогенових станів різного ґенезу. Метою нашого дисертаційного дослідження стало експериментальне вивчення фармакологічних властивостей гелю, окремих показників безпеки та можливих механізмів реалізації його органопротекторної дії.

За результатами проведеного скринінгового дослідження встановлено, що досліджувані гелі з Р і ГК виявилися ефективними за умов інтравагінального 28-денного введення оваріоектомованим самкам щурів, оскільки стримували підвищення маси тіла, що виникало на фоні дефіциту естрогенів, нормалізували температуру тіла біля кореня хвоста (попереджаючи прояви симптомів припливів жару), сприяли відновленню вагінального біотопу та кислого середовища вагінального секрету, запобігали розвитку атрофічних змін слизової оболонки піхви. За результатами інтегральної оцінки ефективності лікувальної дії вагінальних гелів встановлено, що оптимальний вміст Р у складі лікарської форми становить 0,5 %, оскільки за переважною більшістю показників на моделі експериментального гіпоестрогенового стану у тварин він отримав найбільшу кількість балів, тобто виявився найбільш ефективним. Дані експериментального дослідження свідчать про наявність не тільки місцевої, а й слабкої системної дії вагінальної лікарської форми комбінованого складу з Р і ГК, що обумовлюють необхідність подальшого поглибленого вивчення запропонованої композиції. Результати даного етапу дослідження стали експериментальним обґрунтуванням доцільності розробки та всебічного вивчення вагінального гелю з фітоестрогеном Р і ГК як альтернативної гормоновмісним препаратам групи ліків для терапії патологічних гіпоестрогенових станів різного ґенезу, перш за все генітоуринальних проявів клімактеричного синдрому.

Наступним етапом стало вивчення профілю безпеки вагінального гелю комбінованого складу з Р та ГК, зокрема дослідження місцевої переносимості, гострої токсичності при одноразовому інтравагінальному (і/ваг) і

внутрішньошлунковому (в/ш) введенні та хронічічної токсичності гелю при багаторазовому (90-денному) і/ваг уведенні щурам.

Встановлено, що вагінальний гель з Р та ГК не викликає місцевого подразнення за умов одноразового та тривалого вагінального застосування. Результати вивчення гострої токсичності гелю з Р та ГК дозволяють віднести його до нетоксичних речовин, а саме — V класу токсичності (практично не токсична речовина) за класифікацією К. К. Сидорова [193]. Дані щодо тривалого і/ваг уведення свідчать про відстутність загальнотоксичного впливу на тварин та місцевоподразнювальної дії з боку слизової оболонки нижнього відділу генітального тракту.

Поглиблене фармакологічне вивчення фармакодинаміки вагінального гелю з Р та ГК було проведено на двох моделях, що максимально наближалися до клінічних умов розвитку гіпоестрогенових станів.

На моделі білатеральної оваріоектомії (хірургічної кастрації) було досліджено фармакологічну дію вагінального гелю на місцеві (генітоуринальні) та системні прояви гіпоестрогенії.

Показано, що при 28-денному введенні лікувальна дія гелю з Р та ГК проявлялася уповільненням темпів приросту маси тіла тварин. На відміну від не лікованих самок групи КП, де збільшення маси тіла склало 23 %, у тварин, що отримували лікування вагінальним гелем, після 4-х тижнів лікування приріст маси тіла становив не більше 6 %, а у тварин, що отримували препарат порівняння — крем із синтетичним естрогеном проместрином — 6,8 %. Свідченням системної лікувальної дії гелю з Р і ГК був достовірно менше виражений симптом підвищення температури біля кореня хвоста (це відповідає клімактеричному симптому приливів жару у жінок). У тварин групи КП порівняно з інтактними самками цей показник збільшувався на 10 %, тоді як під впливом лікування гелем із фітоестрогеном він збільшувався лише на 1,0 %, а під впливом препарату порівняння — на 1,6 %. Ефективність вагінального гелю проявлялася позитивним впливом на баланс статевих

гормонів, рівень естрадіолу був 1,5 разу, а прогестерону у 1,4 разу вищим, ніж у нелікованих тварин, за виразністю терапевтичної дії гель практично не поступався ефективності топічного препарату порівняння проместрину.

Встановлено, що під впливом лікування гелем з Р та ГК найбільш виразно зменшувалися патологічні прояви гіпоестрогенії з боку слизової оболонки вагіни. За сумарним показником макроскопічних проявів гель із фітоестрогеном зменшував ознаки гіпоестрогенової атрофії з 7 балів, що відмічалася у тварин групи КП, до 2 балів, не поступаючись за ефективністю фармакологічної активності крему з естрогеном. Це корелювало з достовірним позитивним впливом вагінального гелю на структурно-функціональний стан слизової оболонки піхви, що доведено гістологічними дослідженнями, зокрема відображалося збільшенням товщини епітеліальної пластинки, появою ознак типової естрогеноподібної дії, посиленням регенеративних процесів, слизеутворенням та відновленням рівня pH вагінального секрету до рівня фізіологічних значень (4,4–4,5).

Зменшення ризику розвитку серцево-судинних захворювань, мабуть, один з найвідоміших ефектів ресвератролу, що пояснював так званий «французський пародокс». Багатьма дослідниками були показані механізми кардіопротекції, в тому числі на моделях атеросклерозу, цукрового діабету, серцевої недостатності тощо. Застосування ресвератролу сприяло зменшенню площі вогнища некрозу при інфаркті міокарда, індукованого хірургічної травмою, оклюзією середньої мозкової артерії. Позитивний вплив ресвератролу на серцево-судинну систему реалізується через покращення ендотеліальної функції. Одним з механізмів цього впливу – це збільшення синтезу оксиду нітрогену (NO) і інгібування його деградації [200].

В наших дослідженнях ми також підтвердили здатність ресверетролу покращувати стан серцевого м’яза та кісткової системи у тварин після білатеральної оваріоектомії. Нами виявлений протективний вплив вагінального гелю з Р та ГК та його здатність стримувати розвиток дегенеративних змін в

міокарді, суглобовому хрящі та субхондральній трабекулярній кістці, що виникають у нелікованих самок щурів із дефіцитом естрогенів. За здатністю усувати генітальні прояви гіпоестрогенії, кардіо- та хондропротекторним впливом гель з Р та ГК не поступався дії топічного препрату порівняння проместрину.

На моделі фармакологічної кастрації самок щурів були досліджені можливі механізми нейропротективної дії гелю з Р та ГК та його вплив на поведінкові реакції, що характеризують функціональний стан ЦНС.

Методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу були визначені характер експресії основних ендогенних маркерів нейропротекції: мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos і вміст HSP70 у цитоплазмі і мітохондріях в CA1-зоні гіпокампу головного мозку самок щурів. Встановлено, що експресія мРНК HIF-1α у групі КП була на 92,2 % нижче в порівнянні з групою ІК. Також було зареєстровано зниження експресії мРНК HSP70 на 92,5 % і мРНК c-fos на 80,6 %. Імуноферментним аналізом було встановлено зниження концентрації білків теплового шоку HSP70 у мітохондріях на 61 % і цитозолі головного мозку тварин із гіроестрогенією.

При лікуванні тварин із набутим гіпоестрогеновим станом, що виникав внаслідок фармакологічної кастрації, вагінальним гелем з Р та ГК відбувалося підвищення на 150 % експресії мРНК HIF-1α мРНК HSP70 на 33 % і на 200 % — мРНК c-fos у зоні CA1 гіпокампу. Але більш вираженого нейропротективного ефекту вдалося досягти в комбінованій терапії гелем із Р та ГК разом із внутрішньошлунковим уведенням ресвератролу дозою 100 мг/кг. Топічна дія, посилена системним впливом фітоестрогену ресвератролу, приводила до значно більшої експресії мРНК HIF-1α, мРНК HSP70 і мРНК c-fos у CA1 гіпокампі тварин з гіпоестрогеновим станом в 23 рази, у 30,7 разу і 6,7 разу відповідно, приводячи ці показники до показників тварин групи ІК або підвищуючи їх в 2,3 разу (мРНК HSP70). Комбіноване введення вагінального гелю і таблеток із ревератролом самкам щурів із гіпоестрогенемією достовірно

збільшувало концентрацію HSP70 у цитозольних і мітохондріальних фракціях головного мозку на 118 і 177 % відповідно.

Моделювання гіпоестрогенемії VCD призводило до значного дефіциту прогестерону, а також до зниження естрадіолу на фоні вираженого підвищення ФСГ [194]. Естрадіол і особливо прогестерон відіграють важливу роль у механізмах ендогенної цито- і нейропротекції, регулюють процеси навчання, пам'ять, психо-емоційної поведінки [195]. Наші дослідження не суперечать цим висновками. Так, виявлене нами зниження експресії мРНК c-fos свідчить про пригнічення транскрипційної активності в нейронах гіпокампу у самок щурів із VCD-гіпоестрогенемією.

Відомо, що в ініціації механізми ендогенної нейропротекції певну роль відіграють фактори транскрипції (c-fos і c-jun), які запускають експресію генів білків теплового шоку (HSP70 і HSP72), а також фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1). C-fos відіграють вирішальну роль у контролі над клітинним циклом, розвитком, зростанням і клітинним диференціюванням, а також визначають долю диференційованих нейронів, беруть участь у переданні інформації від клітини до клітини. При зриві адаптаційних можливостей організму, різкому збільшенні АФК і дефіциті відновлених тіолів відбувається інактивація факторів транскрипції з подальшим пригніченням експресії генів c-fos [182]. Виявлене зниження експресії мРНК HSP70 і концентрації HSP70 у головному мозку щурів із VCD-гіпоестрогенемією може бути обумовлено як дефіцитом прогестерону, так і дефіцитом глутатіону.

Відомо, що характерним клітинним проявом ішемії є агрегація і накопичення денатурованих білків, активація вільнорадикальних процесів і кальцієве перевантаження. HSP70 можуть обмежувати накопичення денатурованих білків, активацію вільнорадикальних процесів, підвищуючи потужність антиоксидантних ферментів і обмежуючи ушкоджені ефекти кальцієвого перевантаження за рахунок зв'язування рецептора кальцію — кальмодуліну, а також обмежуючи експресію iNOS [197]. Було показано

здатність HSP70 пролонгувати час життя основного адаптаційного фактора — HIF-1α, який в екстремальних умовах ініціює запуск компенсаторних механізмів вироблення енергії [184].

Отже, експериментальна гіпоестрогенемія призводить до вираженої депривації механізмів ендогенної нейропротекції, пов'язаних із HSP70. Виявлені нейропротективні властивості ресвератролу особливо при комбінованому застосуванні його лікарських форм — вагінального гелю і таблеток можна пояснити наступним. Відомо, що естрогени, у т. ч. і фітоестрогени здатні моделювати експресію глобальних чинників транскрипції, відповідальних за синтез HSP-білків. Крім того, активація модуляції β-естрогенових рецепторів головного мозку обумовлює від'єднання від останніх HSP70-білків, що забезпечує входження цих білків всередину клітини і реалізацію їх біологічної функції. Механізм цієї взаємодії пов'язаний з роллю HSP70 у підтримці в неактивному стані естрогенових рецепторів, не пов'язаних з естрогенами [198] Припускають, що зворотний зв'язок рецептора зі стероїдним лігандом призводить до конформаційних змін молекули рецептора, вивільнення його з комплексу з білками теплового шоку та їх входження всередину клітини.

Флавоноїд ресвератрол може за рахунок АФК/SH-регуляції підвищувати активність естрогенових рецепторів, зниженою під дією оксидативного стресу [199]. Модулятори естрогенових рецепторів можуть посилювати експресію HSP70 за рахунок стимулюючого впливу на білковий фактор транскрипції — фактор теплового шоку (FHS) [184]. Естрогенові модулятори можуть гальмувати нейроапоптоз за рахунок зниження активності каспаз-3 і зниження активності двох факторів транскрипції ядерного фактора-κB (p65/RelA і p50), регулюючи експресію гена раннього реагування c-fos. Ресвератрол також може працювати як прямий антиоксидант, тому що він має фенольну групу і може вловлювати активні форми кисню та азоту і тим самим регулювати каскад JNK (чутливого до АФК). JNK викликає активацію ДНК-зв'язуючих білків cJun, c-

Fos і AP-1, а зв'язування цих білків із паліндромними послідовностями ДНК викликає індукцію апоптозу [194].

В умовах трансмітерного аутокоїдозу в нейронах (мозочок, гіпокамп, кора) спостерігаються активація нейрональної синтази NO (nNOS) і підвищення продукування NO, що бере участь в ініціюванні нейроапоптозу, відкриття пори мітохондрії і формуванні мітохондріальної дисфункції, нітрозуванні SH-вмісних сигнальних молекул і втрати ними функцій, а також зниження активності Zn-Cu-супероксидазу [201]. Найбільш зловісна роль у пошкодженні нейронів належить індуцибельній формі NOS, експресія якої гліальними клітинами призводить до гіперпродукції не стільки оксиду нітрогену NO, як його численними цитотоксичними формами від пероксинітриту до іона нітрозонію. У регуляції експресії iNOS та активації нітрозативного стресу важливу роль відіграє низький рівень відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи і зростання концентрації протизапальних цитокінів, особливо (білок, який кодується однойменним геном) IL-1b. Так, IL-1b активують AP-1 й універсальний фактор транскрипції (NF-kB), які в умовах ішемії змінюють клітинний сигналітет і підсилюють експресію інших протизапальних факторів, стимулюють астроцитами експресію iNOS [202]. Надлишок IL-1b здатний негативно впливати на транспорт відновленого глутатіону, знижувати його синтез. Дефіцит внутрішньоклітинного глутатіону, який бере участь у механізмах транспорту NO та його біодоступність, посилює утворення ONOO- [203]. Відома роль IL-1b у модуляції експресії білків теплового шоку HSP70, зокрема від підвищення до пригнічення залежно від його концентрації [204].

Модуляція експресії різних ізоформ NOS, спрямована на їх нормалізацію та гальмування нітрозативного стресу, під дією ресвератролу при різних шляхах його введення в різних лікарських формах може бути пояснена таким. Ресвератрол у силу своєї хімічної структури може регулювати активність двох факторів транскрипції ядерного фактора-κB (p65/RelA і p50). Також він може

працювати як прямий антиоксидант, за рахунок фенольної групи зв'язувати активні форми кисню і тим самим гальмувати АФК-залежний механізм активації IL-1b і iNOS. Також антиоксидантна дія ресвератрола може бути пояснена тим, що збільшення концентрації естрадіолу під його дією, призводить до Е2-залежної активації експресії мітохондріальної Мп-СОД. Підвищена експресія Мп-СОД значно знижує потоки нейротоксичності супероксиду, що виробляється мітохондріями.

Виявлено, що збільшення концентрації окисленої форми глутатіону приводить до підвищення продукування протизапальних цитокінів TNF-α, IL-1β, IL-6 і IL-8, які у свою чергу, підвищують дефіцит глутатіону, відновленого за рахунок порушення його транспорту в клітину і посилюють механізми нейродеструкції [205]. Підвищена концентрація окислених інтермедіантів тіол-дисульфідної системи пригнічує експресію eNOS (див. вище) і збільшує вироблення (активна форма кисню) АФК за рахунок вивільнення арахідонової кислоти з тромбоцитів, пригнічує ГПР і ГР, а також стимулює шлях внутрішньоклітинної передачі сигналів, включаючи нейроапоптоз.

Курсове введення гелю в групі з Р та ГК оваріоектомованим самкам щурів сприяло нормалізації функціонального стану ЦНС — орієнтовно-дослідницької активності та зменшення проявів вегетативно-емоційних реакцій, що майже досягало рівня групи інтактних тварин. Це можна розцінювати як прояв антидепресивної дії ресвератролу в умовах дефіциту естрогенів.

Протективний вплив ресвератролу на нервову тканину опосередковується кількома механізмами. Один з них, пов'язаний з посиленням активності системи оксиду нітрогену був продемонстрований в плацебо-контрольованому клінічному дослідженні із застосуванням ресвератролу у 22 здорових осіб. У відповідь на збільшення активності NO-синтази під дією ресвератролу підвищується NO-залежна вазодилатація і як наслідок – спостерігається посилення церебральної перфузії. Інший механізм

нейропротективної дії ресвератролу зобов'язаний його антиоксидантним властивостям. Ресвератрол зменшував активність перекисного окиснення ліпідів і деструкцію нервових клітин в тканинах головного мозку не тільки в експериментах на моделях токсичного ураження, але й при патологічній активації оксидативного стресу при ожирінні [206-212].

У нашому дослідженні комбінована терапія гелем і таблетками з ресвератролом продемонструвала найбільш виражений психотропний ефект, який повністю усував у тварин прояви депресії, що виникали внаслідок дефіциту естрогенів. За ступенем впливу на всі досліджувальні показники стану ЦНС комбіноване введення гелю і таблеток із ревератролом достовірно перевершувало монотерапію гелем з Р та ГК та дію препарату порівняння з синтетичним естрогеном проместрином. Отримані нами результати узгоджуються з даними зарубіжних дослідників, які встановили, що ресвератрол покращує моторну і координаційну функцію, підвищує швидкість навчаємості тварин. Ще один з нейропротективних механізмів ресвератролу пов'язаний з його модулювальним ефектом на метаболізм глутамату в мозковій тканині [209].

Отже, отримані нові наукові дані, що дозволили обґрунтувати доцільність розробки інноваційного лікарського засобу місцевої дії з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, встановити оптимальний склад лікарської форми, продемонструвати ефективність лікувальної дії на різних експериментальних моделях гіпоестрогенових станів та з’ясувати окремі механізми його нейропротективної дії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та експериментальне вирішення актуального наукового завдання, що полягало у обґрунтуванні доцільності розробки нового вагінального гелю з ресвератролом (Р) та гіалуроновою кислотою (ГК) для оптимізації лікування гіпоестрогенових станів різного ґенезу.

1. За результатами скринінгового дослідження 4-х тест-зразків вагінального гелю, що відрізнялися різним вмістом ресвератролу (0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 %), а також містили гіалуронову і молочну кислоти та інші допоміжні речовини, встановлено, що найбільшу ефективність на моделі білатеральної оваріоектомії у щурів виявив гель із 0,5 % вмістом ресвератролу. Під його впливом спостерігали більш суттєве зменшення на 1,7 % за період лікування приросту маси тіла тварин, температури тіла за період лікування знизилась на 7,7 % біля кореня хвоста (еквівалент припливів жару), виразніше покращувався стан слизової оболонки вагіни за результатами макро- і мікроскопічного дослідження. За лікувальною дією вагінальний гель з Р та ГК перевищував ефективність препарату порівняння — гель Гінодек.

2. Встановлено, що вагінальний гель з Р та ГК має сприятливий профіль безпеки: не викликає місцевого подразнення за умов одноразового та тривалого вагінального застосування. Результати вивчення гострої токсичності гелю з Р та ГК дозволяють віднести його до нетоксичних речовин, а саме V класу токсичності (практично не токсична речовина) за класифікацією К. К. Сидорова. Дані щодо тривалого і/ваг введення свідчать про відсутність загального токсичного впливу на тварин та місцевоподразнювальної дії з боку слизової оболонки нижнього відділу генітального тракту, а також негативної дії на вміст лактобактерій вагінального біотопу.

3. На моделі білатеральної оваріоектомії у щурів виявлена висока ефективність тест-зразка лідера, вагінального гелю з 0,5 % вмістом Р та ГК, що

проявлялася стабілізацією маси тіла тварин на 5,8 %, зниженням температури біля кореня хвоста на 7,2 %, нормалізацією структури та функціональної активності епітелію слизової оболонки вагіни, збільшенням рівня статевих гормонів (естрадіолу у 1,5 разу, а прогестерону у 1,4 разу) порівняно з нелікованими тваринами, відновленням фізіологічного рівня pH вагінального секрету, який після лікування знизився на 2,6 од. За всіма досліджуваними показниками гель з ресвератролом не поступався ефективності препарату порівняння — крему з синтетичним естрогеном проместрином.

4. За результатами морфологічного дослідження вагінальний гель із ресвератролом та гіауроноою кислотою проявив здатність відновлювати епітеліальний шар слизової оболонки вагіни (збільшуючи його за даними морфометрії на 77,2 %), попереджати негативні дистрофічні зміни у м'язах міокарда і передсердь, стримувати розвиток остеопоретичних змін у тканинах суглобового хряща та субхондральної кістки оваріоектамованих щурів.

5. На моделі хімічної кастрації самок щурів встановлено, що лікування препаратами з ресвератролом приводить до покращення стану ЦНС, зокрема зменшує стресові зміни в гіпокампі, які виникають внаслідок дефіциту естрогенів. У механізмі дії ресвератролу лежить його здатність активувати HSP70-залежні механізми нейропротекції при дефіциті естрогенів, а саме підвищувати експресію мРНК HIF-1α на 96,2 %, мРНК HSP70 96,9 % та мРНК c-fos на 85,2 % при комбінованому режимі терапії (гелем та таблетками з ресвератролом).

6. Порівняльне вивчення ефективності гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою у монотерапії та у поєднанні з введенням таблеток із ревератролом дозою 100 мг/кг оваріоектомованим самкам щурів виявило переваги комбінованого режиму терапії, що проявлялося підвищенням ефективності ендогенної системи нейропротекції, значним покращенням функціональних показників рухової та дослідницької функції тварин, розвитком антидепресивної дії.

7. Отримані результати є науковим обґрунтуванням оптимізації терапії гіпоестрогенових проявів (перш за все генітоуринальних) різного ґенезу, а також доцільності посилення органопротективних ефектів гелю системною фармакологічною дією ресвератролу. Це відкриває перспективи розширення асортименту лікарських засобів природного походження вітчизняного виробництва для сучасної гінекологічної практики.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Szymański, J., Zaręba, K., Jakiel, G., & Słabuszewska-Jóźwiak, A. (2018). Genitourinary syndrome of menopause – is the problem solved? State of the art 2018. *Przeglad Menopauzalny, 17*(4), pp. 168–174. DOI: 10.5114/pm.2018.81741.

2. Faubion, S. S., Sood, R., & Kapoor, E. (2017). Genitourinary Syndrome of Menopause: Management Strategies for the Clinician. *Mayo Clinic Proceedings, 92* (12), 1842-1849. doi:10.1016/j. mayocp.2017.08.019.

3. Іванюк, О. І., Ярних, Т. Г., & Євтушенко, О. М. (2019). Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. (Т. 5), 4, 66–78.

4. Сидоров, К. К. (1979). О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. *Токсикология новых промышленных, химических веществ*. (с. 47–51). (Вып. 13). Москва: Медицина.

5. Плаксина, Н. Д., & Симоновская, Х. Ю. (2014). Возможности негормональной коррекции вазомоторных пароксизмов в постменопаузе. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак*, 2(19), 60–65.

6. *Здоровое старение должно стать глобальным приоритетом. Выпуск новостей* (2014). Возобновлено с https://www.who.int/ru/news/item/06-11-2014--ageing-well-must-be-a-global-priority

7. Иловайская, И. А., & Войташевский, К. В. (2015). Менопаузальная гормональная терапия: возможности и риски. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак, 5*(28), 80–86.

8. Хамошина, М. Б., Роговская, С. И., & Наумчик, Г. А. (2014). Актуальные возможности фармакологии в профилактике возрастных нарушений. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак, 1*(18), 75–81.

9. Шестакова, И. Г., Беттихер, О. А., & Алеев, И. А. (2015). Урогенитальная атрофия как следствие дефицита эстрогенов: излечима и предотвратима. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак*, *5*(28), 52–59.

10. Сметник, В. П. (2014). Старение репродуктивной системы женщины: клинико-гормональное обоснование стадий, терминология. *Доктор.ру. Гинекология. Эндокринология, 12*(100), 13–16.

11. *Менопаузальная гормональная терапия и сохранение здоровья женщин зрелого возраста: Клинические рекомендации (протокол лечения).* (2015). Москва: ФГБУ НЦГАиП.

12. Татарчук, Т. Ф. (2019). Ведение менопаузы: современные тенденции. *Репродуктивная эндокринология*, 46, 19–24. DOI: https://doi.org/10.18370/2309-4117.2019.46.19-37.

13. Татарчук, Т. Ф., Єфіменко, О. О., & Дубовка, К. М. (2012). Проблема клімактерію у практиці сімейного лікаря. *Репродуктивная эндокринология*, 4(6), 22–31.

14. Камінський, В. В., Антипкін, Ю. Г., & Татарчук, Т. Ф. (2017). Збереження якості життя та соціальної активності жінок в пострепродуктивному періоді. Резолюція експертної ради щодо впровадження соціально-інформаційного проекту. *Репродуктивна ендокринологія,* 4, 9–12.

15. Про заходи щодо забезпечення реформування пенсійної системи. № 3668-IV. Відновлено з https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3668-17/ed20130101?lang=en

16. Steiner, A. (2013). Biomarkers of Ovarian Reserve as Predictors of Reproductive Potential. *Semin Reprod Med*, 31(06), 437–42.

17. Sirotkin, A. V. (2011). Growth factors controlling ovarian functions. *Journal of Cellular Physiology*, 226(9), 2222–5.

18. Das, A., Pala, S., Panda, S., & Singh, A. (2014). Vaginal pH: A marker for menopause. *Journal of Mid-life Health*, 5(1), 34.

19. Frank, A., Brown, L. M., & Clegg, D. J. (2014). The role of hypothalamic estrogen r eceptors in metabolic regulation. *Frontiers in neuroendocrinology*, *35*(4), 550–57. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.05.002.

20. Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology*, *389*(1), 71–83. DOI: 10.1016/j. mce.2014.02.002.

21. Weiser, M. J., Foradori, C. D., & Handa, R. J. (2008). Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev*, 57(2), 309–320. DOI: 10.1016/j.brainresrev. 2007.05.013.

22. Юренева, С. В., Ильина, Л. М., & Муллабаева, С. М. (2010). Кожа и половые гормоны (эффекты менопаузы и заместительной гормональной терапии). Обзор. *Акушерство и гинекология*, (6), 16–22.

23. Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology*, 389(1),71–83. DOI: 10.1016/j. mce.2014.02.002.

24. Зайченко, Г. В., Сініцина, О. С., Карпенко, Н. О., Риженко, І. М., & Стрига, О. А. (2019). Розлади жіночого здоров’я внаслідок вікового дефіциту естрогенів та їх корекція. *Журнал Національної академії медичних наук України*, 2 (25), 211–221.

25. Власенко, М. В. (2017). Сучасні підходи до діагностики та лікування патології щитоподібної залози. *Тематичний номер. Діабетологія, Тиреоїдологія, Метаболічні розлади*, 2 (38), 10–12.

26. Попов, А. А., Изможерова, Н. В., & Андреев, А. Н. (2005). Депрессивные нарушения у женщин с менопаузальным синдромом. *Проблемы репродукции, 11*(1), 17–18.

27. Зурикова, С. И., Смирнова, Н. П., Муханова, Л. Ю., & Шишкина, Т. Л. (2003). Эффективность негормональных методов лечения больных с климактерическим синдромом. *Гомеопатия для врачей общей практики*. (с. 25–28). Москва: Медицина.

28. Яковец, С. М., & Лызикова, Ю. А. (2013). Медикобиологические аспекты климактерия. *Проблемы здоровья и экологии,* (1), 51–57.

29. Lucas, R. A., Ganio, M. S., Pearson, J., & Crandall, C. G. (2013). Brain blood flow and cardiovascular responses to hot flashes in postmenopause women. *Menopause*, (Vol. 20 (3), 299–304.

30. Cavallini, A., Dinaro, E., Giocolano, A., Caringella, A., Ferreri, R., Tutino, V., & Loverro, G. (2008). Estrogen receptor (ER) and ER-related receptor expression in normal and atrophic human vagina. *Maturitas*, *59*(3), 219–25. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.01.004.

31. Балан, В. Е. (2009). Вагинальная атрофия в климактерии. *Эффективная фармакотерапия. Акушерство и гинекология*, (3), 44–47.

32. Liu, H. T., Lin, H., & Kuo, H. C. (2011). Increased serum nerve growth factor levels in patients with overactive bladder syndrome refractory to antimuscarinic therapy. *Neurourology and urodynamics*, *30*(8), 1525–1529. DOI: https://doi.org/10.1002/nau.21118.

33. Raz, R., Colodner, R., Rohana, Y., Battino, S., Rottensterich, E., Wasser, I., & Stamm, W. (2003). Effectiveness of estriol-containing vaginal pessaries and nitrofurantoin macrocrystal therapy in the prevention of recurrent urinary tract infection in postmenopausal women. *Clinical infectious diseases*, *36*(11), 1362–1368. DOI: 10.1086/374341.

34. Пушкарь, Д. Ю. (2006). *Тазовые расстройства у женщин: пособие для врачей.* Москва: Прессинформ. 1–52.

35. Danielsson, D., Teigen, P. K., & Moi, H. (2011). The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1230* (1), 48–58. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06041.x.

36. Mirmonsef, P., Hotton, A. L., Gilbert, D., Burgad, D., Landay, A., Weber, K. M., ... Spear, G. T. (2014). Free glycogen in vaginal fluids is associated with Lactobacillus colonization and low vaginal pH. *PloS one*, *9*(7), e102467. DOI: 10.1371/journal. pone.0102467.

37. Доброхотова, Ю. Э., & Затикян, Н. Г. (2008). Современные представления о механизмах развития дисбиоза влагалища. *Акушерство, гинекология и репродукция (*1), 3–6.

38. Кафарская, Л. И., Ефимов, Б. А., & Покровская, М. С. (2005). *Микроэкология влагалища. Микробиоценоз в норме, при патологических состояниях и способы его коррекции. Лекция*. (1–5). Москва.

39. Thornton, M. J., Taylor, A.H., Mulligan, K., Al-Azzawi, F., Lyon, C. C, O'Driscoll, J., & Messenger, A. G. (2003). The distribution of estrogen receptor beta is distinct to that of estrogen recept or alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 8, 100–103. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12181.x

40. Verdier-Sevrain, S., Yaar, M., Cantatore, J., Traish, A., & Gilchrest, B. A. (2004). Estradiol induces proliferation of keratinocytes via receptormediate mechanisms. *The FASEB Journal*, 18,1252–1254. DOI: 10.1096/fj.03- 1088fje.

41. Серов, В. Н. (2010). Терапия урогенитальных расстройств, обусловленных дефицитом эстрогенов. *Акушерство, гинекология и репродукция,* 4 (1), 21–35.

42. Журавльова, Л. В., & Черпіта, В. О. (2020). Гормонально-метаболічний статус жінок, хворих на цукровий діабет II типу, у пре- та постменопаузальний період. *Український ревматологічний журнал,* 81 (3), 64–69.

43. Lizcano, F., & Guzmán, G. (2014). Estrogen deficiency and the origin ofobesity during menopause. *BioMed research international*, 757461. https://doi.org/10.1155/2014/757461.

44. Wakatsuki, A., & Sagara, Y. (2005). Lipoprotein metabolism in postmenopausal and oophorectomized women. *Obstetrics&Gynecology, 85*(4), 523–8. DOI: 10.1016/0029-7844(94)00452-J.

45. Rodriguez-Cuenca, S., Monjo, M., Frontera, M., Gianotti, M., Proenza, A. M., & Roca, P. (2007). Sex steroid receptor expression profile in brown adipose

tissue. Effects of hormonal status. *Cellular Physiology and Biochemistry,* 20(6), 877–86. DOI: 10.1159/000110448.

46. Stice, J. P., Lee, J. S., Pechenino, A. S., & Knowlton, A. A. (2009). Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiology, 5*(1), 93–103. DOI: 10.2217/14796678.5.1.93.

47. Xing, D., Nozell, S., Chen, Y. F., Hage, F., & Oparil, S. (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(3), 289–95. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.182279.

48. Занько, О. В., Болгова, Л. В., Коваленко, Н. В., Татарчук, Т. Ф., & Яроцька, Н. В. (2017). Роль ендотеліальної дисфункції в генезі розвитку клінічних проявів клімактеричного синдрому в жінок у пременопаузі. *Репродуктив. эндокринология,* 5, 58–64.

49. Бобылева, И. В. (2015). Характер обменноэндокринных нарушений у женщин при естественной и хирургической менопаузе. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*, 5(4), 219–221.

50. Duckles, S. P., & Miller, V. M. (2010). Hormonal modulation of endothelial NO production. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 459*(6), 841–51. DOI: 10.1007/s00424-010- 0797-1.

51. 41. Kim, K. H., Young, B. D., & Bender, J. R. (2014). Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *389*(1-2), 65–70.DOI: 10.1016/j.mce.2014.02.001.

52. Buttner, M., Thelen, P., & Jarry, H. (2014). Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 139*, 245–251. DOI: 10.1016/j. jsbmb.2013.03.003.

53. Christian, R. C., Liu, P. Y., Harrington, S., Ruan, M., Miller, V. M., & Fitzpatrick, L. A. (2006). Intimal estrogen receptor (ER)beta, but not ERalpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre- and

postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91*(7), 2713–2720. DOI: 10.1210/jc.2005-2672.

54. Villar, I. C., Hobbs, A. J., & Ahluwalia, A. (2008). Sex differences in vascular function: implication of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *The Journal of Endocrinology*, *197*(3), 447–462. DOI: 10.1677/JOE-08-0070.

55. Luksha, L., Poston, L., Gustafsson, J. A., Hultenby, K., & Kublickiene, K. (2006). The oestrogen receptor beta contributes to sex related differences in endothelial function of murine small arteries via EDHF. *The Journal of Physiology*, *577*(3), 945–955. DOI: 10.1113/ jphysiol.2006.121939.

56. Манушарова, Р. А., & Черкезова, Э. И. (2008). Современные возможности диагностики и лечения климактерического синдрома. *Русский Медицинский Журнал, 16*(25), 1712–1716.

57. Дворянский, С. А., Емельянова, Д. И., & Яговкина, Н. В. (2017). Климактерический синдром: современное состояние вопроса (обзор литературы). *Вятский медицинский вестник,* 1(53), 7–15.

58. Поворознюк, В. В., & Григорьева, Н. В. (2012). Менопауза и остеопороз. *Reproductive Endocrinology,* (4), 40–47.

59. Raisz, L. G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation, 115*(12), 3318–3325. DOI: 10.1172/JCI27071.

60. Ищейкина, Л. К., & Нетюхайло, Л. Г. (2014). Форми порушення метаболізму кісткової тканини (огляд літератури). *Молодий вчений*, (8), 122–127.

61. O'Sullivan, S. M., Grey, A. B., Singh, R., & Reid, I. R. (2006). Bisphosphonates in pregnancy and lactation-associated osteoporosis. *Osteoporosis International*, 17(7),1008–1012. DOI: 10.1007/s00198-006- 0112-3.

62. Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews, 31*(3), 266–300. DOI: 10.1210/er.2009-0024.

63. Сметник, В. П., & Ильина, Л. М. (2009). Роль половых гормонов в развитии метаболических расстройств у женщин в пери- и ранней постменопаузе. *Климактерий,* 1, 8–13.

64. Юренева, С. В., & Ермакова, Е. И. (2017). Оценка эффективности альтернативных методов лечения менопаузальных симптомов у женщин в постменопаузе. *Гинекология,* 19 (1), 21–26.

65. Татарчук, Т. Ф., & Педаченко, Н. Ю. (2018) Менопауза: оптимальні методи для покращення якості життя жінки. *Гінекологія, Акушерство, Репродуктологія*, 1(29), 50–54.

66. Raz, R., & Stamm, W. E. (1993). A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *The New England Journal of medicine, 329,* 753–756. DOI: 10.1056/ NEJM199309093291102.

67. Notelovitz, M. (1993). Proceedings of the first International Workshop on Estring: proceedings of a workshop by sponsored Kabi Pharmicia, held at Chвteau d'Esclimont in St Symphorien-le-Chвteau, France,*Royal Society of Medicine*, *203*, 11–17.

68. Welton, A. J., Vickers, M. R., Kim, J., Ford, D., Lawton, B. A., MacLennan, A.H., ... Meade, T. W. (2008). Health related quality of life after combined hormone replacement therapy: randomised controlled trial. *BMJ,337*, a1190. DOI: 10.1136/bmj.a1190.

69. Дикевич, Е. А. (2007). Некоторые вопросы коррекции психоэмоциональных расстройств, связанных с климаксом. *Русский медицинский журнал*. 15, 28–33.

70. Сапронов, Н. С., Федотова, Ю. О., & Лосев, Н. А. (2007). Комбинированное применение реминила с овестином для коррекции когнитивных расстройств у женщин с гипоэстрогенным синдромом. *Психофармакология и биологическая наркология,* 7(3–4), 2190–2194.

71. Sator, P. G., Sator, M. O., Schmidt, J. B., Nahavandi, H., Radakovic, S., Huber, J. C., & Hunigsmann, H. (2007). A prospective, randomized, double-blind,

placebo-controlled study on the influence of a hormone replacement therapy on skin aging in postmenopausal women. *Climacteric,* 10, 320–34. DOI: 10.1080/13697130701444073.

72. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., ... Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA, 288*(3), 321–333. https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321.

73. Taylor, H. S., & Manson, J. E. (2011). Update in hormone therapy use in menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96*(2), 255–264. DOI: 10.1210/ jc.2010-0536.

74. Clarkson, T. B., Melendez, G. C., & Appt, S. E. (2013). Timing hypothesis for postmenopausal hormone therapy: its origin, current status, and future. *Menopause*, *20*, 342–53. DOI: 10.1097/ gme.0b013e3182843aad.

75. Schierbeck, L. L., Rejnmark, L., Tofteng, C. L., Stilgren, L., Eiken, P., Mosekilde, L., ... Beck Jensen, J. E. (2012). Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ*, *345*, e6409. DOI: 10.1136/bmj.e6409.

76. Harvey, R. E., Coffman, K. E., & Miller, V. M. (2015). Women-specific factors to consider in risk, diagnosis and treatment of cardiovascular disease. *Women's Health, 11*(2), 239–57. DOI: 10.2217/WHE.14.64.

77. Kanis, J. A., Burlet, N., C. Cooper, Delmas, P. D., Reginster J.-Y, Borgstrцm, F., Rizzoli, R. (2008) Європейські рекомендації з діагностики та ведення остеопорозу у жінок в постменопаузальному періоді. *Український ревматологічний журнал,* 4(34), 10–32.

78. Kaunitz, A. M., & Manson, J. E. (2015). Management of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*, 126(4), 859–76. DOI: 10.1097/AOG.0000000000001058.

79. Al-Baghdadi, O., & Ewies A. A. (2009). Topical estrogen therapy in the management of postmenopausal vaginal atrophy: an up-to-date overview. *Climacteric*, 12, 91–105. DOI: 10.1080/13697130802585576.

80. Балан, В. Е., Ковалева, Л. А., Амирова, Ж. С., & Рафаэлян, И. В. (2011). Возможности гормональной терапии урогенитальной атрофии у женщин. *Акушерство и гинекология,* 6, 113–116.

81. Сычева, Е. Г., & Аполихина, И. А. (2015). Коррекция эстроген-дефицитных состояний у женщин с урогенитальными расстройствами. *Акушерство и гинекология*, 4, 73–77.

82. Серов, В. Н., & Жаров, Е. В. (2011). Терапия больных с урогенитальными расстройствами после хирургической менопаузы. *Акушерство и гинекология*, (7–2), 73–77.

83. Горбенко, Н. І., Таран, К. В., Боріков, О., Оксененко, С. В., Іванова, О. В., Степанова, А. В. та ін. (2009). Вплив похідного естрадіолу ПЕ0607 на метаболічні прояви синдрому інсулінорезистентності за умов гіпоестрогенії у щурів. *Проблеми ендокринної патології,* (3), 78–86.

84. Таран, К. В., Горбенко, Н. І., Іванова, О. В., & Яременко, Ф. Г. (2011). Протективний ефект похідного естрадіолу ПЕ0607 щодо розвитку метаболічних проявів синдрому інсулінорезистентності, індукованого високофруктозною дієтою у оваріектомованих щурів. *Проблеми ендокринної патології*, (1), 32–38.

85. Heiss, G., Wallace, R., Anderson, G. L., Aragaki, A., Beresford, S. A., Brzyski, R., ... WHI Investigators (2008). Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA*, 299(9), 1036–1045. https://doi.org/10.1001/jama.299.9.1036.

86. Rosano, G. M., Vitale, C., & & Tulli, A. (2006). Managing cardiovascular risk in menopausal women. *Climacteric*, 9(sup1), 19–27. DOI: 10.1080/13697130600917732.

87. Макацария, А. Д., Пшеничникова, Е. Б., Пшеничникова, Т. Б., & Бицадзе, В. О. (2006). *Метаболический синдром и тромбофилия в акушерстве и гинекологии.* Москва: МИА.

88. Dinger, J., Mhoner, S., & Heinemann, K. (2016). Cardiovascular risks associated with the use of drospirenone-containing combined oral contraceptives. *Contraception, 93*(5), 378–385. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26825258/

89. Kong, X.X., Fu, Y.C., J.J. Xu, J.J. (2011). Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. *Endocrinol. Invest*, Vol. 34, № 11, 374-381.

91. Ботоева, Е. А. (2010). К вопросу о фитоэстрогенах (обзор литературы). *Бюллетень Восточно–Сибирского научного центра,* 2, 234–238.

92. Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., & Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 38(1), 15–25.

93. Коренева, Е. М. (2007). Фитоэстрогены. Влияние на репродуктивную систему. *Проблеми ендокринної патології,* 3, 87–95.

94. Никитин, А. И. (2002). Гормоноподобные ксенобиотики и репродуктивная система. *Проблемы репродукции,* 2, 5–15.

95. Wocławek–Potocka, I., Mannelli, C., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T., & Skarżyński, D. J. (2013). Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. *International Journal of Endocrinology*. http://dx.doi.org/10.1155/2013/650984

96. Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine–disrupting chemicals. *Toxicological Science*, 94, (1), 3–21.

97. Сомова, Е. В. (2001). Влияние фитоэстрогенов на уровень половых гормонов и фертильность крыс. *Проблеми ендокринної патології,* 1, 82–93.

98. Еременко, Р. Ф., & Малоштан, Л. Н. (2014). Влияние экстракта травы люцерны посевной (Medicago sativa L.) на уровень половых гормонов у крыс–

самок. *Вестник Витебского государственного медицинского университета,* 13(5), 118–123.

99. Гладкова, А. И., Смоленко, Н. П., Сомова, Е. В., & Селюкова, Н. Ю. (2009). Половое поведение крыс после назначения фитоэстрогенов в разные периоды онтогенеза. *Проблеми ендокринної патології,* 4, 85–93.

100. Frye, C. A., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, Panzica, G. C. (2012). Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology*, 24(1), 144–159. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x

101. Xue, Y. Q., Di, J. M., Luo, Y., Cheng, K. J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 765-832. https://doi.org/10.1155/2014/765832.

102. Cassidy, A., Albertazzi, P., Nielsen, I. L., Hall, W., Williamson, G., Tetens, I., ... Branca, F. (2006). Critical review of health effects of soyabean phyto–oestrogens in post–menopausal women. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 76–92.

103. Rietjens, I. M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology, 174*(11), 1263–1280. DOI: 10.1111/bph.13622.

104. Зайдиева, Я. З., & Балан, В. Е. (2000). Применение фитоэстрогенов для лечения гипоэстрогенных состояний. *Русский медицинский журнал*, 3, 157–163.

105. Серов, В. Н. (2014). Негормональные методы лечения патологического климактерия. *Акушерство и гинекология,* 11, 96–101.

106. Gocmen, A. Y., & Burgucu, D. (2011). Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40-CD40L system as a potential target. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(3), 323–330.

107. Egorova, Tju. (2006). Zhurn Grodnenskogo gos med un-ta, 2 (14), 36–38.

108. Shperling, N. V., Shperling, I. A., & Arutjunjan, A. A. (2015). Akusherstvo i ginekologija, 6, 104–109.

109. Zajcev, G. P., Grishin, J. V., & Mosolkova, V. E. (2015). *Vinogradstvo i vinodelie,* 45, 110–112.

110. Baur, J. A., & Sinchlair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the vivo evidence. *Nat. Resourc. Drug Discov*, 5, 493-501.

111. Zaytsev, G. P., Mosolkova, V. E., & Zaytsev, G. P. (2015). FItoaleksini vInogradu I vishnI. *Vinogradstvo i vinodelie,* 45, 110–112.

113. Liu, Y., Ma, W., Zhang, P., He, S., & Huang, D. (2015). Effect of resveratrol on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland),* 34(1), 27–34. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.03.009

114. Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2011). Synergism between resveratrol and other phytochemicals: Implications for obesity and osteoporosis. *Molecular Nutrition&Food Research,* 55(8), 1177–1185. DOI: 10.1002/mnfr.201000616.

115. Reznichenko, N. A., & Majljan, J. A. (2014). *Problemy starenija i dolgoletija*, 23 (2), 178–191.

116. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Савченко, Н. В., & Стрига, О. А. (2020). Механізми кардіо- та вазопротекторної дії ресвератролу. *Фармакологія та лікарська токсикологія,* 14(4) https://doi.org/10.33250/14.04.223.

117. Das, S., Cordis, G. A., Maulik, N., & Das, D. K. (2005). Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 288(1), 328–335.

118. Chen, Y. R., Yi, F. F., Li, X. Y., Wang, C. Y., Chen, L., Yang, X. C., ... Cai, J. (2008). Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-

term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovascular drugs and therapy*, 22(6), 479–485. https://doi.org/10.1007/s10557-008-6141-8

119. Raj, P., Louis, X. L., & Thandapilly, S. J. (2014). *Life Sciences*, 95 (2), 63-71. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.12.011.

120. Shalwala, M., Zhu, S. G., Das, A., Salloum, F. N., Xi, L., & Kukreja, R. C. (2014). Sirtuin 1 (SIRT1) activation mediates sildenafil induced delayed cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *PloS one*, 9(1), e86977. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086977

121. Usta, E., Mustafi, M., Walker, T., & Ziemer, G. (2011). Resveratrol suppresses apoptosis in intact human cardiac tissue - in vitro model simulating extracorporeal circulation. *The Journal of cardiovascular surgery, 52*(3), 399–409.

122. Rocha-González, H. I., Ambriz-Tututi, M., & Granados-Soto, V. (2008). Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics, 14*(3), 234–247. https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00045.x

123. Latruffe, N., Lançon, A., Frazzi, R., Aires, V., Delmas, D., Michaille, J. J., ... Cherkaoui-Malki, M. (2015). Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1348*(1), 97–106. https://doi.org/10.1111/nyas.12819.

124. Zordoky, B. N., Robertson, I. M., & Dyck, J. R. (2015). Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1852, 6, 1155–1177.

125. Зайченко, Г. В., Горчакова, Н. О., Стрига, О. А., & Рубан, О. І. (2017). Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини, 4*(1), 21–30.

126. Понеделькина, Н. Ю., Лукина, Е.С., & Финовков, В. Н. (2008). Кислые аминоагликаны и их химическая модификация. *Биоорганическая химия, 34*(1), 5–28.

127. Сигаева, Н. Н., Колесов, С. В., Назаров, П. В., & Вильданова, Р. Р. (2012). Химическая модификация гиалуроновой кислоты и её применение в медицине. *Вестник Башкирского университета, 17*(3), 1220-1241.

128. Рахматуллина, Л. Р., Барышева, Е. С., & Рахматуллина, Р. Р. (2010). Разработка клеточных биоматриц на основе гиалуроновой кислоты. *Современные наукоемкие технологии, 2,* 111–112.

129. Березовский, В. А., Богомолец, О. В., & Деркач, Н. Н. (2011). К вопросу об экзогенной регуляции физиологической регенерации кожи человека. *Український журнал дерматології, венерології, косметології, 3*, 9-14.

130. Антипова, Е. В. (2013). *Лазерофорез гиалуроновой кислоты в коррекции возрастания изменений микроциркуляции и кислородного обмена клеток кожи.* (Автореф. дисс. канд. биол. наук). Мед. ин-т «РЕАВИЗ» Москва.

131. Турашев, А. Д., Тищенко, А. Д., & Максименко, А. В. (2007). Состояния деструкции и реконструкции околоклеточной углеводной об олочки лингинальной сосудистой поверхности в атерогенезе. *Кардиологический вестник, 2*(2), 64–68.

132. Татузян, Е. Г., Беловол, А. Н., & Ткаченко, С. Г. (2015). Решение деликатных проблем без хирургического вмешательства. *Дерматологія та венерологія, 1,* 75–79.

133. Медведев, М. В. (2015). Неинфекционные вагиниты – проблема 21 века. *Здоровье женщины,1*, 45–48.

134. Tersigni, C., Di Simone, N., Tempestilli, E., Cianfrini, F., Russo, R., Moruzzi, M. C., ... Villa, P. (2015). Non-hormonal treatment of vulvo-vaginal atrophy-related symptoms in post-menopausal women. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology, 35*(8), 835–838. https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1014326

135. Chen, C. P., Huns, W., & Lin, S. H. (2014). Effectiveness of hyaluronic acid for treating diabetic foot: a systematic review and meta-analysis. *Dermatologie, 27*(6), 331–336.

136. Иванов, Д. Д., & Домбровский, Я. А. (2016). Применение препаратов гиалуроновой кислоты в терапии хронического цистита. *Почки*, *3*, 85-89.

137. Cicione, A., Cantello, F., & Ucciero, G. (2014). Restoring the glycosamini noglycane layer in recurrent aystitis: experimental and clinical foundations. *International Journal of Urology*, *21*(8), 763–768.

138. Kim, A., Lim, B., Song, M., & Choo, M. S. (2014). Pretreatment features to influence effectiveness of intravesical hyaluronic acid instillation in refractory interstitial cystitis. Painfull bladder syndrome. *International neurourology journal*, *18*, 163–167.

139. Rooney, P., Srivastava, A., Watson, L., Quinlan, L. R., & Pandit, A. (2015). Hyaluronic acid decreases IL-6 and IL-8 secretion and permeability in an inflammatory model of interstitial cystitis. *Acta biomaterialia, 19*, 66–75. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.030.

140. Доброхотова, Ю. Э., & Затикян, Н. Г. (2008). Современные представления о механизмах развития дисбиоза влагалища. *Акушерство, гинекология и репродукция, 1*, 3–6.

141. Кира, Е. Ф. (2014). Микроэкология влагалища. *Механизмы стабильности и методы коррекции, 31*(11), 75–81.

142. Доброхотова, Ю. Э., & Затикян, Н. Г. (2008). Гормональний статус и микробиоценоз влагалища. *ОРЖИН. Акушерство. Гинекология. Репродукция*, *2*(2), 7–10.

143. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. (1986). Страсбург.

144. Про захист тварин від жорстокого поводження. № 3447-IV. Ст.230 (2006).

145. Киршенблат, Я. Д. (1969). *Практикум по эндокринологии*. Москва, 1969, 55–57.

146. Al–Safi, Z. A., & Polotsky, A. J. (2015). Obesity and Menopause. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 29*(4), 548–553.

147. Bowe, J., Li, X. F., Kinsey-Jones, J., Heyerick, A., Brain, S., Milligan, S., & O'Byrne, K. (2006). The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes. *The Journal of endocrinology*, *191*(2), 399–405. https://doi.org/10.1677/joe.1.06919.

148. Волянський, Ю. Л., Гриценко І. С., & Широбоков В. П. (2004). *Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: метод. рекомендації*. Київ: Здоров'я.

149. Кира, Е. Ф. (2014). Микроэкология влагалища. *Механизмы стабильности и методы коррекции*, *31*(11), 75–81.

150. Viktorov, I. V., & Proshin, S. S. (2003). Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, enbessing into paraffin, and processing of paraffin sections. *Bulletin of experimental biology and medicine*, *136*(1), 105-6.

151. Chijimatsu, R., Ikeya, M., Yasui, Y., Ikeda, Y., Ebina, K., Moriguchi, Y., ... Norimasa, N. (2017). Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells International*, 1960965.

152. Шестакова, И. Г., Беттихер, О. А., & Алеев, И. А. (2015). Урогенитальная атрофия как следствие дефицита эстрогенов: излечима и предотвратима. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак*, *5* (28), 52–59.

153. Özel, F., Kiray, M., Göker, A., Aydemir, S., & Mıcılı, S. C. (2020). Protective effect of alpha lipoic acid on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced primary ovarian failure in female rats. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(2), 293–300.

154. Гур'янов, В. Г., Лях, Ю. Є., Парій, В. Д., Короткий, О. В., Чалий, О. В., Чалий, К. О., Цехмістер, Я. В. (2018). *Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R–statistics: Навчальний посібник*. Київ: Вістка.

155. Меркулов, Г. А. (1969). *Курс патологогистологической техники*. Москва: Медицина.

156. Лапач, С. Н., Губенко, А. В., & Бабич, П. Н. (2001). *Статистические методы в медико–биологических исследованиях с использованием Excel*. Київ: МОРИОН, 408.

157. Халафян, А. А. (2007). *STATISTICA 6. Статистический анализ данных. Учебник.* (3-е изд.) Москва: ООО «Бином-Пресс».

158. Меркулов, Г. А. (1969). *Курс патологогистологической техники*. Ленинград: Медицина.

159. Радзинский, В. Е., & Добрецова, Т. А. (2015). Менопауза как механизм женского старения. Фитоэстрогены – разведка боем. StatusPraesens. *Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак*, 2(25), 51–58.

160. Сухих, Г. Т., Сметник, В. П., Юренева, С. В., Ермакова Е. И., Чернуха Г. Е., & Якушевская О. В. (2016). Менопауза и климактерическое состояние у женщин. *Клинические рекомендации,* 54 с.

161. Иловайская, И. А., & Войташевский, К. В. (2015). Менопаузальная гормональная терапия: возможности и риски. *Status Praesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак,* 5 (28), 80–86.

162. Обоскалова, Т. А., Воронцова, А. В., Звычайный, М. А., & Саттарова, В. В., (2015). Вагинальные лубриканты как фактор коррекции трофической и секреторной функции слизистой влагалища в возрасте репродукции и менопаузального перехода. *Уральский медицинский журнал,* 5, 45–49.

163. Ермакова, Е. И. (2019). Генитоуринарный менопаузальный синдром: диагностика и принципы лечения. *Медицинский Совет,* Т. 13, 106–111.

164. Шестакова, И. Г., Беттихер, О. А., & Алеев, И. А. (2015). Урогенитальная атрофия как следствие дефицита эстрогенов: излечима и предотвратима. *Status Praesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак,* 5 (28), 52–59.

165. Юренева, С. В., Ермакова, Е. И., & Глазунова, А. В. (2016). Диагностика и терапия генитоуринарного менопаузального синдрома у пациенток в пери- и постменопаузе (краткие клинические рекомендации). *Акушерство и гинекология,* 5, 138–144. https://doi.org/10.18565/ aig.2016.5.138-144.

166. Sinha, A., & Ewies, A. A. (2013). Non-hormonal topical treatment of vulvovaginal atrophy: an up-todate overview. *Climacteric*, V.16(3), 305–312. https://doi.org/10.3109/13697137.2012.756466.

167. Макацария, А. Д., Блинов, Д. В., Бицадзе, В. О., & Хизроева, Д. Х. (2019). Лечение эстриолом вульвовагинальной атрофии в постменопаузе: обновление научных данных 2014–2018 гг. *Акушерство, гинекология и репродукция,* Т. 13 (3), 227–238. https://doi.org/10.3390/foods9030340.

168. Зайченко, Г. В., Стрига, О. А., Мироненко, О. І., & Іванюк, О. І. (2020). Фармакологічне обґрунтування вибору оптимального складу нового вагінального гелю з ресвератролом і гіалуроновою кислотою. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, *14* (6), 397–412.

169. Трахтенберг, И. М. (1991). *Проблема нормы в токсикологии. (Современные представления и методические подходы, основные параметры и константы)*. Москва, Медицина. 208 с.

170. Коваленко, В. М., Стефанов, О. В., & Максимов, Ю. М. (2000). Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів. *Методичні рекомендації,* Київ, 2000.

171. Лікарські засоби. (2009). *Належна лабораторна практика.* Київ, Міністерство охорони здоров'я України.

172. Сидоров, К. К. (1973). *Токсикология новых промышленных химических веществ*. (Вып.3). Москва: Медицина Вып. 47 с.

173. Julie, M. Hall, Heather R. Powell, & Lara Rajic et al. (2019), The Role of Dietary Phytoestrogens and the Nuclear Receptor PPARγ in Adipogenesis: An in

Vitro Study. *Environ Health Perspect*, Mar, 127(3), 037007. doi: 10.1289/EHP3444 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6768326/

174. Радзинский, В. Е., & Добрецова, Т. А. (2015). Менопауза как механизм женского старения. Фитоэстрогены – разведка боем. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак,* 2 (25), 51–58. Возобновлено из https://vrachjournal.ru/25877305-2019-09-17

175. Morrow, P. K., Mattair, D. N., & Hortobagyi, G. N. (2011). Hot flashes: a review of pathophysiology and treatment modalities. *Oncologist,* Vol. 16, 11, 1658–1664. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22042786/ PMID: 22042786 PMCID: PMC3233302 DOI: 10.1634 / теонколог.2011-0174.

176. Шестакова, И. Г., Беттихер, О. А., & Алеев, И. А. (2015). Урогенитальная атрофия как следствие дефицита эстрогенов: излечима и предотвратима. *StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак*, *5* (28), 52–59.

177. Стрига, О. А., Зайченко, Г. В., Савосько, С. І., & Сорокопуд, К. Ю. (2021). Дослідження фармакологічних властивостей вагінального гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою в умовах експериментального гіпоестрогенового стану у щурів. *Медична наука України*, *17*(1), 61–69.

178. Stice, J. P., Lee, J. S., Pechenino, A. S., & Knowlton, A. A. (2009) Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiol*, 5(1), 93–103. DOI: 10.2217/14796678.5.1.93.

179. Татарова Н. А., Линде В. А., Жидкова Е. В., & Сохадзе Х. С. (2009). Негормональная коррекция климактерических расстройств в пери- и постменопаузе. *Менопауза,* 7, 4–7.

180. Abolaji, A., Omozokpia, M., Oluwamuyide, O., Akintola, T. & Farombi, E. (2020). Rescue role of hesperidin in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced toxicity in the brain, ovary and uterus of wistar rats. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 31(2). https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0115.

181. Анищенко, А. М. (2014). *Фитоэстрогены как альтернатива заместительной гормональной терапии при гипоэстрогенемии (экспериментальное исследование*. (Дисс. доктора. мед. наук.). НИИ фармакологии имени Е. Д. Гольберга, Томск.

182. Belenichev I. F., Pavlov, I. S., Odnokoz, O. V., Belenicheva, O. I, & Polyakova, E. N. (2012). The neuroprotective activity of tamoxifen and tibolone during glutathione depletion in vitro. *Neurochemical Journal*, Vol.6, 3, 202-212.

183.Беленичев И. Ф., Чекман И. С., Нагорная Е. А., Горбачева С. В., Горчакова Н. А., & Бухтиярова Н. В. (2020). Тиол-дисульфидная система: роль в эндогенной цито- и органопротекции, пути фармакологической модуляции. Киев, Юстон.

184. Беленичев, И. Ф., Черний, В. И., Бухтиярова, Н. В., Горчакова, Н. А., & Нагорная, Е. А (2015). Нейропротекция и нейропластичность. Киев, Логос.

185. Тювина, Н. А. (2011). Дифференциальная диагностика и лечение депрессивных расстройств у женщин в период климактерия. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика,* 1, 66–71.

186. Гальцев, Е. В., & Казенашев, В. В. (2007). Психосоциальный дискомфорт у женщин с естроген– обусловленными урогенитальными расстройствами. *Акушерство. Гинекология. Репродукция,* 2, 5–9.

187. Юренева, С. В., & Каменецкая, Т. Я. (2007). Депрессивные расстройства у женщин в пери– и постменопаузе. *Журн. Гинекол,* 9, 5–12.

188. Chen, G. H., Cheng Wang, Han-Yu Yangcheng, Rong-Yu Liu, & Jiang-Ning Zhou (2007). Age–related changes in anxiety are task–specific in the senescence–accelerated prone mouse 8. *Physiol. Beh*, Vol. 91, 5, 644–651.

189. Бабичев, В. Н. (2005). Нейроэндокринный эффект половых гормонов. *Успехи физиологических наук,* 1, 54–67.

190. Татарчук, Т. Ф., та ін. (2018). *Репродуктивна ендокринологія* 6(44), 2309-4117. Відновлено з www.reproduct-endo.com.ua.

191. Кулавский, В. А., Кулавский, Е. В., & Зиганшин, А. М. (2016). Хирургическая менопауза у женщин репродуктивного возраста. *Акушерство, гинекология и репродукция,* 4, 105–113.

192. Дубоссарская, З. М. (2018). Концептуальная модель необходимости преодоления климактерических расстройств. *Клиническая лекция. Здоровье женщины,* 6 (132), 109–112.

193. Сидоров, К. К. (1979). О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. *Токсикология новых промышленных, химических веществ.* (с. 47–51). Москва, Медицина.

194. Коцабин, Н. В., & Макарчук, О. М. (2015). Особливості гормональних взаємовідносин у жінок різних вікових груп з невдалими спробами допоміжних репродуктивних технологій в анамнезі. *Здоровье женщины*, 5 (101), 1992, 5921.

195. Lobo R. A., Gershenson D. M., Lentz G. M. et al. (2017) Menopause and care of the mature woman: endocrinology, consequences of estrogen deficiency, effects of hormone therapy, and other treatment options. Comprehensive Gynecolo-gy. Elsevier, Philadelphia, chap. 14.

196. Горбачова, С. В., Бєленічев, І. Ф., & Абрамов, А. В. (2015). Вплив тіолових антиоксидантів на прояви ендотеліальної дисфункції в судинах головного мозку щурів з порушенням мозкового кровообігу. *Медична хімія,* 2, 9–14.

197. Witte, A.V., Kerti, L, Margulies, D. S., & Floel, A. (2014). Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci*, 34, 7862–70.

198. Столяр, О. Б. (2017). *Молекулярна біологія. Навчальний посібник* Київ, КНТ. 224 с.

199. Ma, T., Tan, M. S., Yu, J. T., & Tan, L. (2014). Resveratrol as a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Biomed Res Int,* 350516.

200. Успенская, Ю. Б. (2014). Клинические эффекты ресвератрола. *Гинекология.* (Т- 16, 5), 96-100. https://www.elibrary.ru/.

201. Fischer, T. W., Kleszczyńsk, K., & Hardkop. L. H. (2013). Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR- induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J. Pineal Res.* 54, 303–312. https://doi.org/10.1111/jpi.12018.

202. Vrienda, J. (2015). The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. V. 401, 5, 213–220. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.013.

203. Belenichev, I. F., Yu., V., Bila, A. (2018). Study of the Expression Pattern of mRNA Hsp70 and the Level of HSP70 Protein in Experimental Subtotal Ischemia and in the Contrast of Pharmacological Correction of HSP70 Modulators. *Biological Marker*. 75-84. http://www.m-hikari.com › bmgt › bmgt1-2018.

204. Беленичев, И. Ф., Била, Ю. В. (2017). Взаимосвязь между концентрацией HSP70, активностью тиол-дисульфидной системы и степенью неврологических нарушений при моделировании острой церебральной ишемии. *Вісник проблем біології і медицини*. 1 (135), 86–91.

205. Gauron, C., Meda, F., & Dupont, E. (2016). Hydrogen peroxide (H2O2) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev. Biol.* V.414, 133–141.

206. Tsai, S. K., Hung, L. M., & Huang, S. S. (2007). Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg.* 46(2), 346-53. https://doi. org/10.1016/j.jvs.2007.04.044. PMID: 17600658.

207. Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., & Islam, F. (2010). Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1328, 139-51. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.031. PMID: 20167206.

208. Kumar, A., Negi, G., Sharma, S. S. (2013). Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms. *Curr Med Chem.* 20(36), 4640-5. https://doi.org/ 10.2174/09298673113209990151. PMID: 24206125.

209. Lin, C. J., Chen, T. H., Yang, L. Y., Shih, C. M. (2014). Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death. *Cell Death*. 5, 1147-50.

210. Lu, K. T., Ko, M. C., & Chen, B.Y. (2008). Neuroprotective Effects of Resveratrol on MPTP-Induced Neuron Loss Mediated by Free Radical Scavenging. *J Agric Food Chem* 56, 6910–3. https://doi.org/10.2174 / 09298673113209990151.

211. Rege, S. D., Kumar, S., Wilson, D. N., & Babu, J. R. (2013). Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev*. https://doi.org/10.1155/2013/419092. PMID: 24163719. PMCID: PMC3791828.

212. Saleh, M. C., Connell, B. J., Saleh, T. M. (2010). Resveratrol preconditioning induces cellular stress proteins and is mediated via NMDA and estrogen receptors. *Neuroscience*. 166, 445–54. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.060. PMID: 20040366.

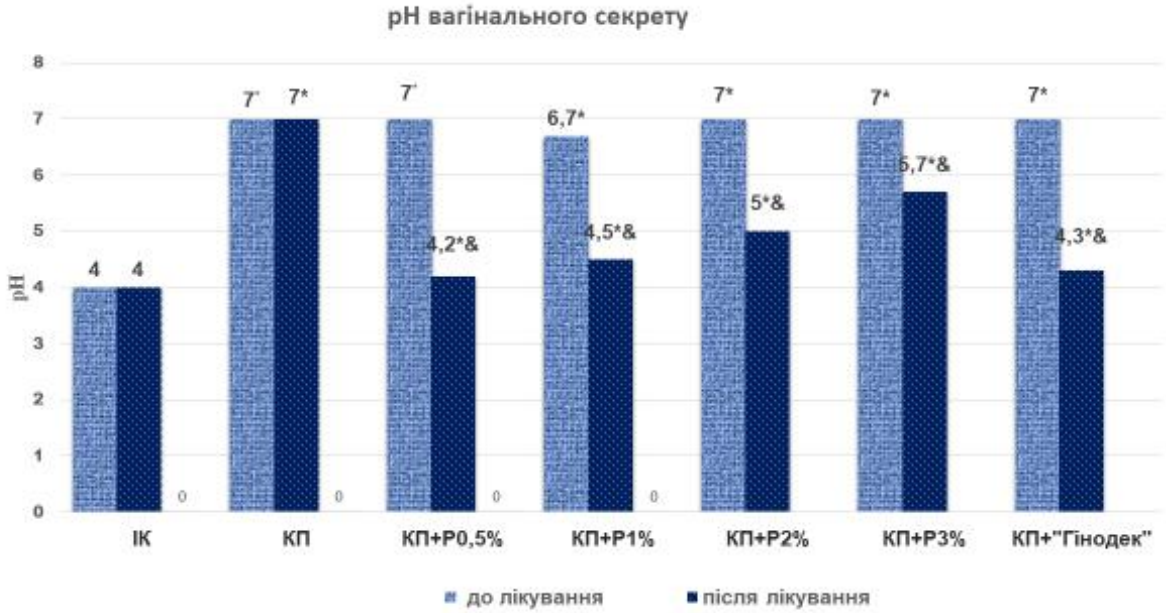
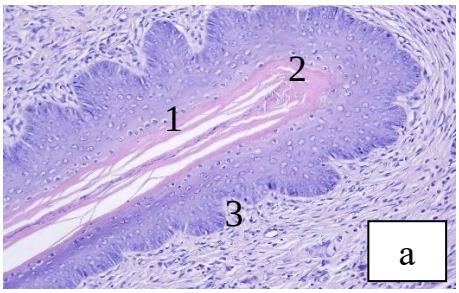


Рисунок 3. pH вагінального секрету у самок щурів до та після лікування тест-зразками, у групах інтактний контроль, контрольна патологія, контрольна патологія + гель ресвератрол 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, контрольна патологія + "Гінодек".

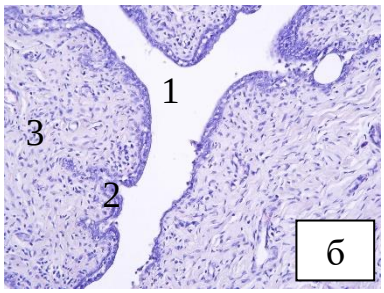
Примітка. *p <0,05 порівняно з групою тварин інтактний контроль;

&p <0,05 порівняно з групою тварин контрольна патологія.

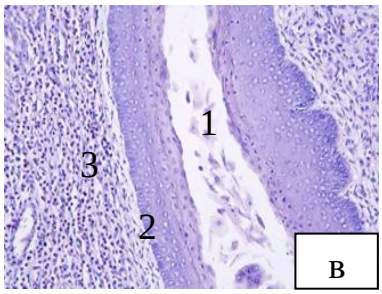
Додаток А
(до розділу 3)



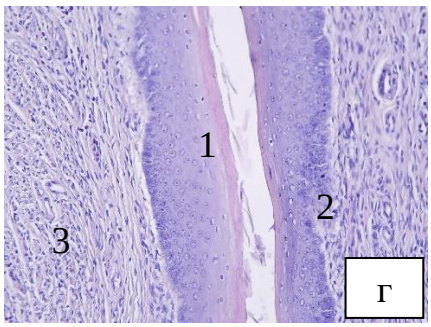
а – ІК



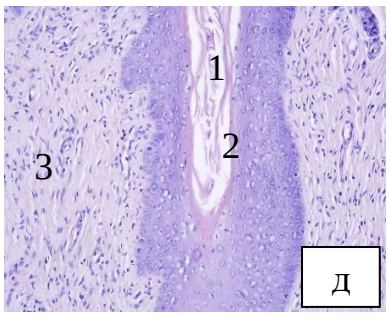
б – КП



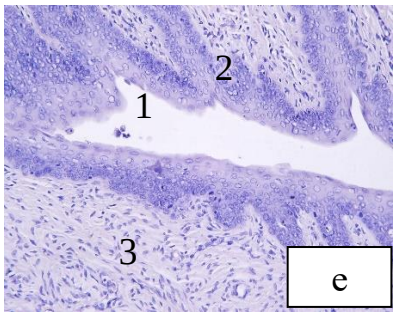
в – КП + гель з Р 0,5%



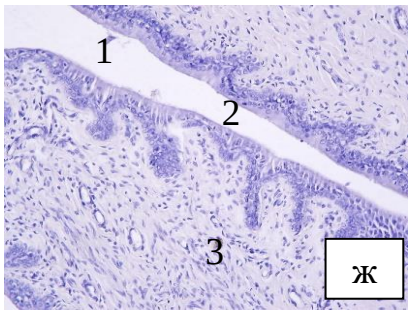
г – КП + гель з Р 1%



д – КП + гель з Р 2%



е – КП + гель з Р 3%



ж – КП + гель «Гінодек»

Примітка: 1 – просвіт піхви; 2 – епітеліальна пластинка; 3 – власна пластинка слизової оболонки. Гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Рисунок 4. Гістологічна будова епітелію піхви самок щурів:

а – інтактний контроль – фізіологічний стан слизової оболонки піхви інтактних самок щурів;

б – контрольна патологія – морфологічний стан слизової оболонки піхви самок щурів групи КП, після овариоектомії. Різке зменшення товщини епітеліальної пластинки, як прояв атрофічних змін епітелію слизової оболонки піхви;

в, г, д, е – контрольна патологія + гель ресвератрол 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % – морфологічний стан слизової оболонки піхви самок щурів. Виражені відновні

процеси епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви самок. Регенерація епітелію;

ж – контрольна патологія + "Гінодек" – морфологічний стан слизової оболонки піхви самок щурів, оваріоектомовані самки щурів яким уводили гель «Гінодек». Активація відновного процесу, атрофічні прояви епітеліальної пластинки.

Забарвлення гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Додаток А
(до розділу 3)

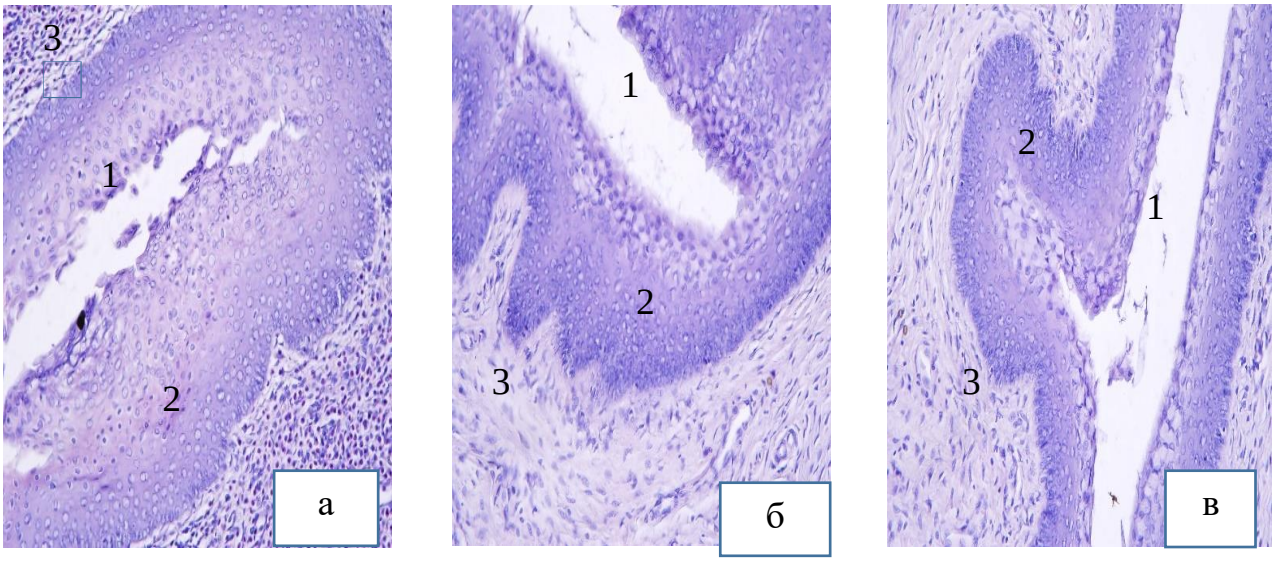


Рисунок 5. Хронічна токсичність. Гістологічна будова епітелію піхви самок щурів: а – інтактний контроль (епітеліальний пласт і власна пластинка слизової, нормальний фізіологічний стан);
б – після введення гелю з ресвератролом та гіалуроновою кислотою протягом 90 діб (потовщена структура епітелію і власної пластинки.);
в – післядія 14 діб (нормальний стан епітелію і власної пластинки).
Забарвлення гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Додаток В
(до розділу 4)

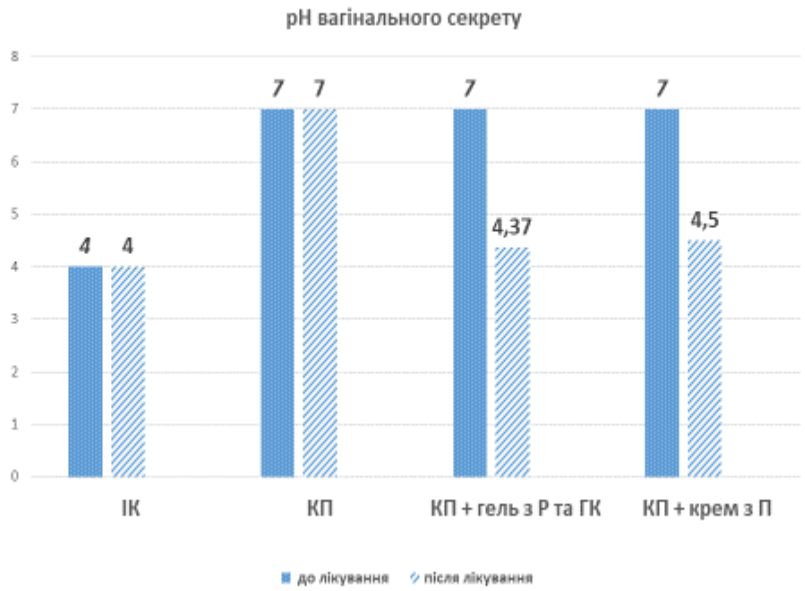
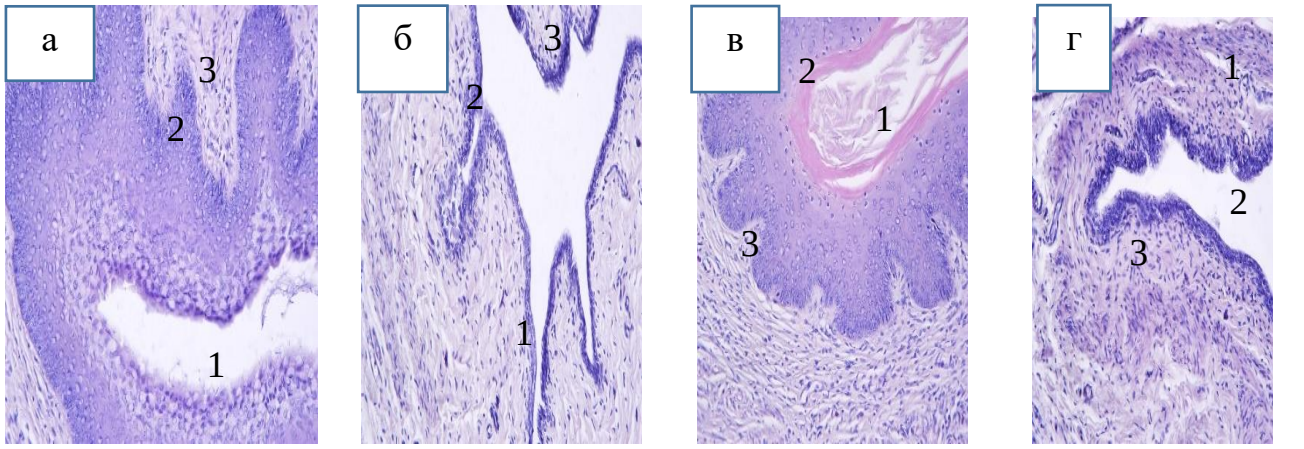


Рисунок 6. Значення pH вагінального секрету у самок щурів до та після лікування тест-зразками у групах інтактний контроль, контрольна патологія, контрольна патологія + гель ресвератрол 0,5 % та гіалуронова кислота, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою; контрольна патологія + крем з проместріном, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Примітки: перші стовпчики в парах – вихідні значення pH; другі стовпчики – значення pH після 28-денного курсу лікування тест-зразками.

Додаток В
(до розділу 4)



а-ІК б-КП в-гель з Р та ГК г- крем з П

Рисунок 7. Морфологічний і гістологічний стан епітеліальної пластинки піхви:

а – інтактний контроль (фізіологічний стан);

б – контрольна патологія, після овариоектомії (різке зменшення товщини епітеліальної пластинки, як прояв атрофічних змін епітелію слизової оболонки піхви);

в – контрольна патологія + гель ресвератрол 0,5 % та гіалуронова кислота, овариоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, (виражені відновні процеси епітеліальної пластинки слизової оболонки піхви, регенерація епітелію);

г – контрольна патологія + крем з проместріном, овариоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном, (активація відновного процесу, атрофічні прояви епітеліальної пластинки).

Примітки: 1 – просвіт піхви; 2 – епітеліальна пластинка; 3 – власна пластинка слизової оболонки. Забарвлення гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Додаток В
(до розділу 4)

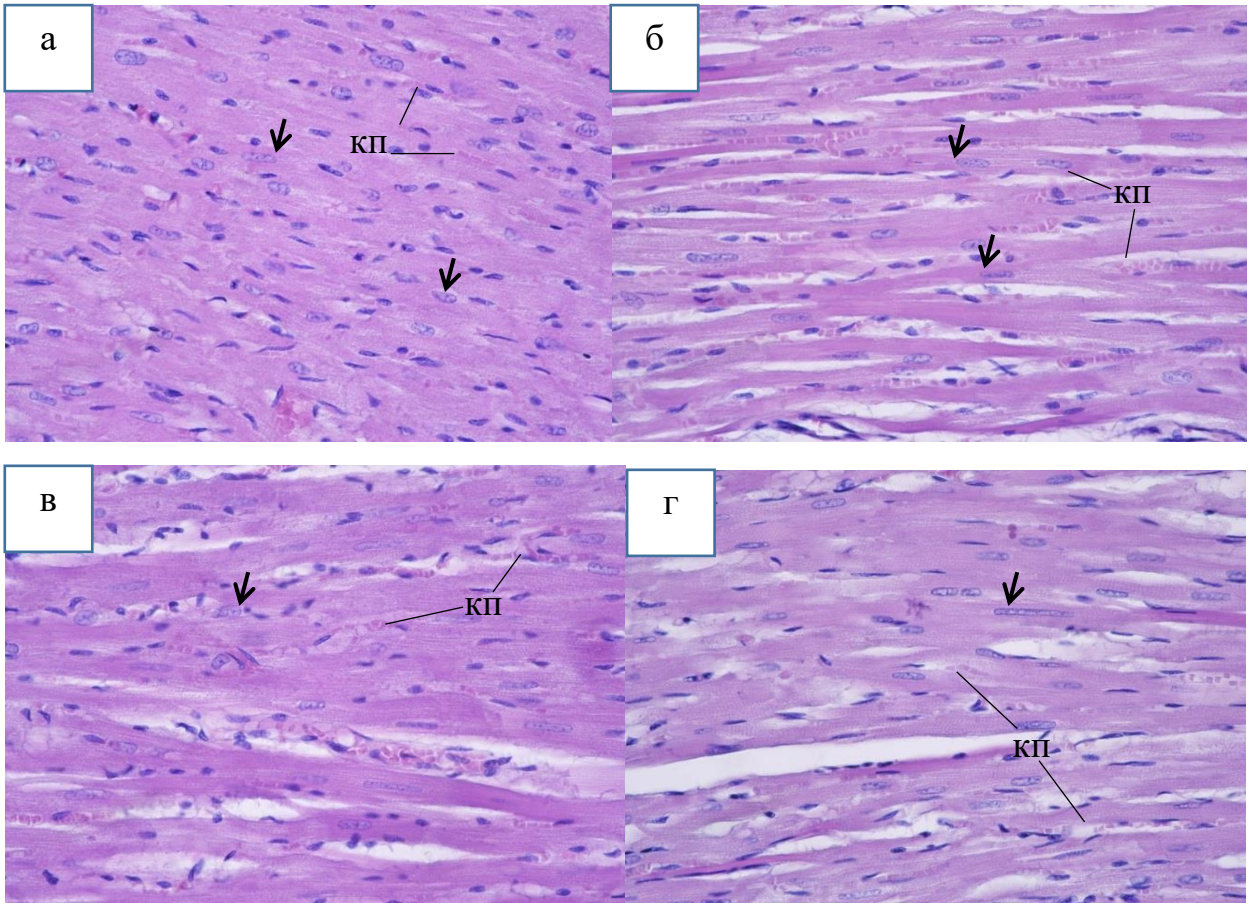


Рисунок 8. Гістологічна будова міокарду шлуночка серця щурів інтактної та дослідних груп:

а – інтактний контроль – будова міокарду шлуночка серця фізіологічна норма,

б – контрольна патологія – збільшення інтерстиційного простору між кардіоміоцитами міокарду, зменшення діаметру кардіоміоцитів, еритроцитарних стаз кровоносних капілярів;

в – контрольна патологія + гель ресвератролом та гіалуроновою кислотою, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою; збільшення діаметру кардіоміоцитів у порівнняні із групою контрольна патологія, зменьшення інтерстиційного простору між кардіоміоцитами міокарду;

г – контрольна патологія + крем з проместріном еритроцитарних стаз кровоносних капілярів, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Примітка: ← ядра кардіоміоцитів; кп – кровоносний капіляр.

Забарвлення гематоксилін-еозин, об. 40, ок. 10.

Додаток В
(до розділу 4)

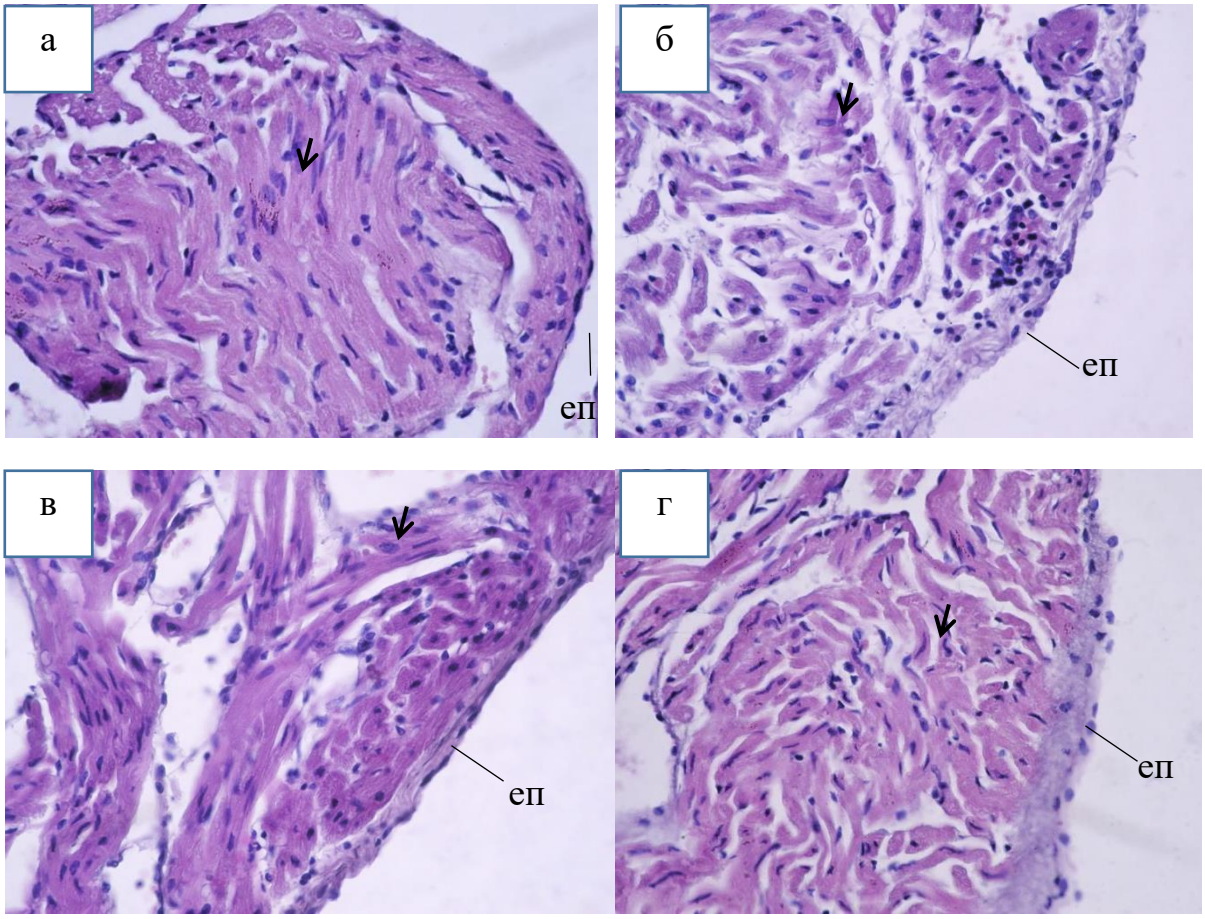


Рисунок 9. Гістологічна будова міокарду передсердь серця щурів інтактної та дослідних груп після лікування тест-зразками:

а – інтактний контроль;

б – контрольна патологія – збільшення товщини і структурні зміни епікарду, поява лімфоцитів, зменшення діаметру кардіоміоцитів у дослідних групах

в – контрольна патологія + гель ресвератролом та гіалуроновою кислотою, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, збільшення діаметру кардіоміоцитів у порівнняні з контрольною групою;

г – контрольна патологія + крем з проместріном зменшення діаметру кардіоміоцитів у дослідних групах, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Примітка: ← ядра кардіоміоцитів; еп – епікард.

Забарвлення гематоксилін-еозин, об. 40, ок. 10.

Додаток В

(до розділу 4)

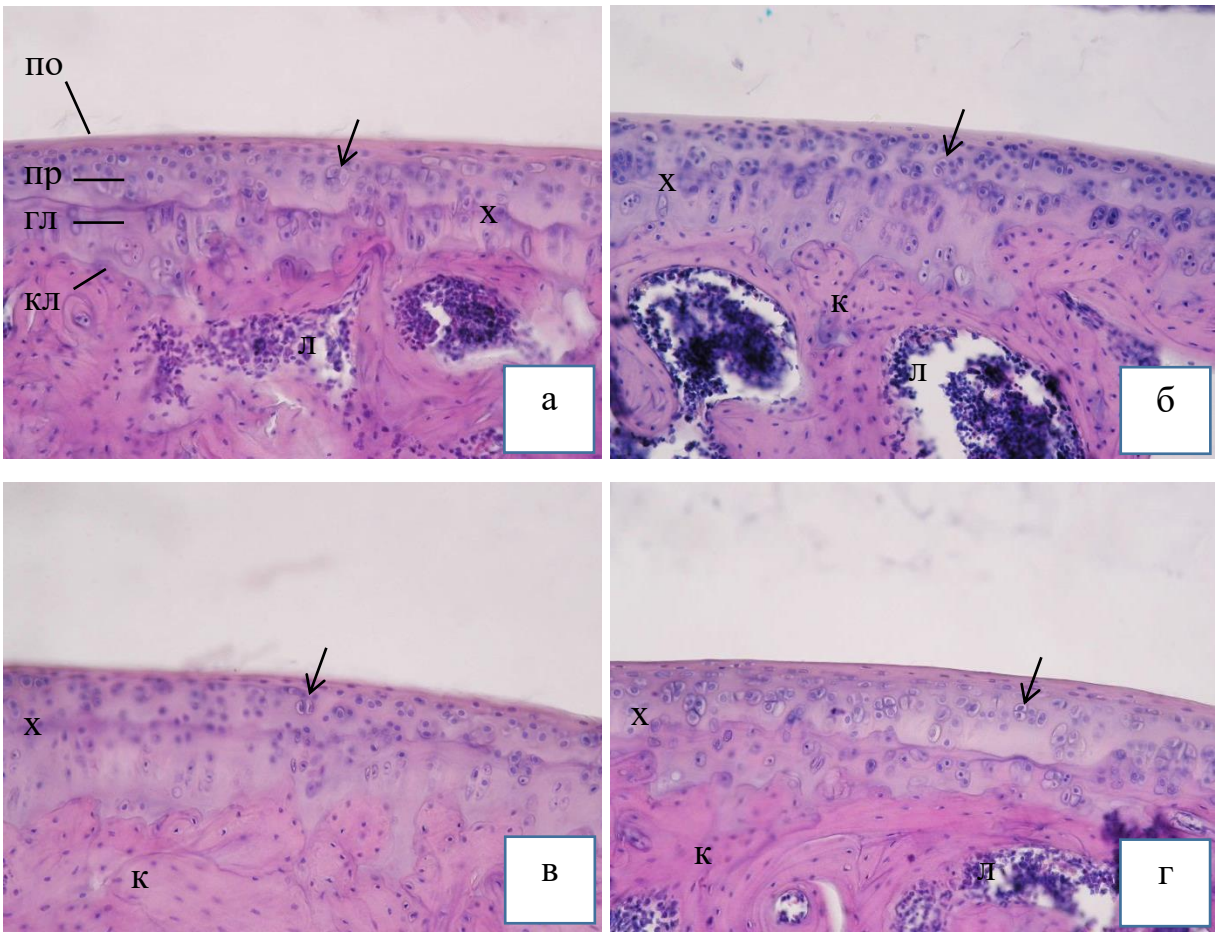


Рисунок 10. Гістологічна будова епіфізарного хряща великогомілкової кістки щурів

Непорушена загальноморфологічна організація епіфізарного хряща і субхондральної кісткової тканини.

а – інтактний контроль; б – контрольна патологія;

в – контрольна патологія + гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою;

г – контрольна патологія + крем з проместріном, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Примітка: ← ізогенні групи хондроцитів; л – лакуни з червоним кістковим мозком; к – кортикальна кісткова тканина; х – епіфізарний хрящ: по – поверхневий шар; пр. – перехідний шар; гл – глибокий шар; кл – кальцинований шар.

Забавлення гематоксилін-еозин, об. 20, ок. 10.

Додаток В
(до розділу 4)

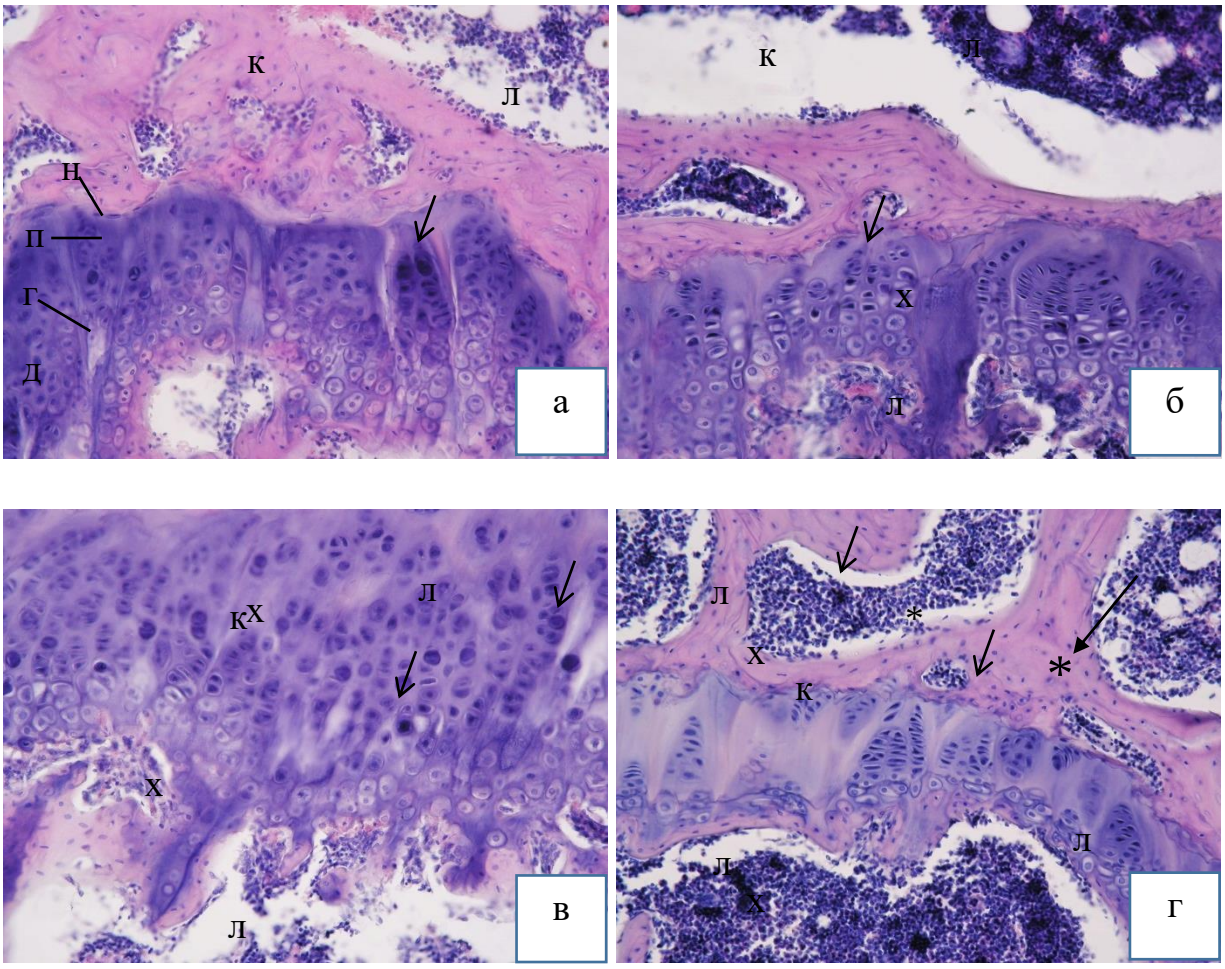


Рисунок 11. Структурні зміни метафізарної пластинки великогомілкової кістки. а – інтактний контроль; б – контрольна патологія – фокальна дегенерація у зоні росту хряща метафаза (зона проліферації і гіпертрофії);

в – контрольна патологія + гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою;

г – контрольна патологія + крем з проместріном, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Прімітка: ← зона стовпчастого хряща; к – кісткова тканина; х – хрящова тканина: – зона незмінених ізогенних груп, п – зона проліферації, г – зона гіпертрофії, д – зона дегенерації; л – лакуни з червоним кістковим мозком; * –

ділянки дегенерації і редукції ізогенних груп хондроцитів. Забарвлення гематоксилін-еозин об. 20, ок. 10.

Додаток В

(до розділу 4)

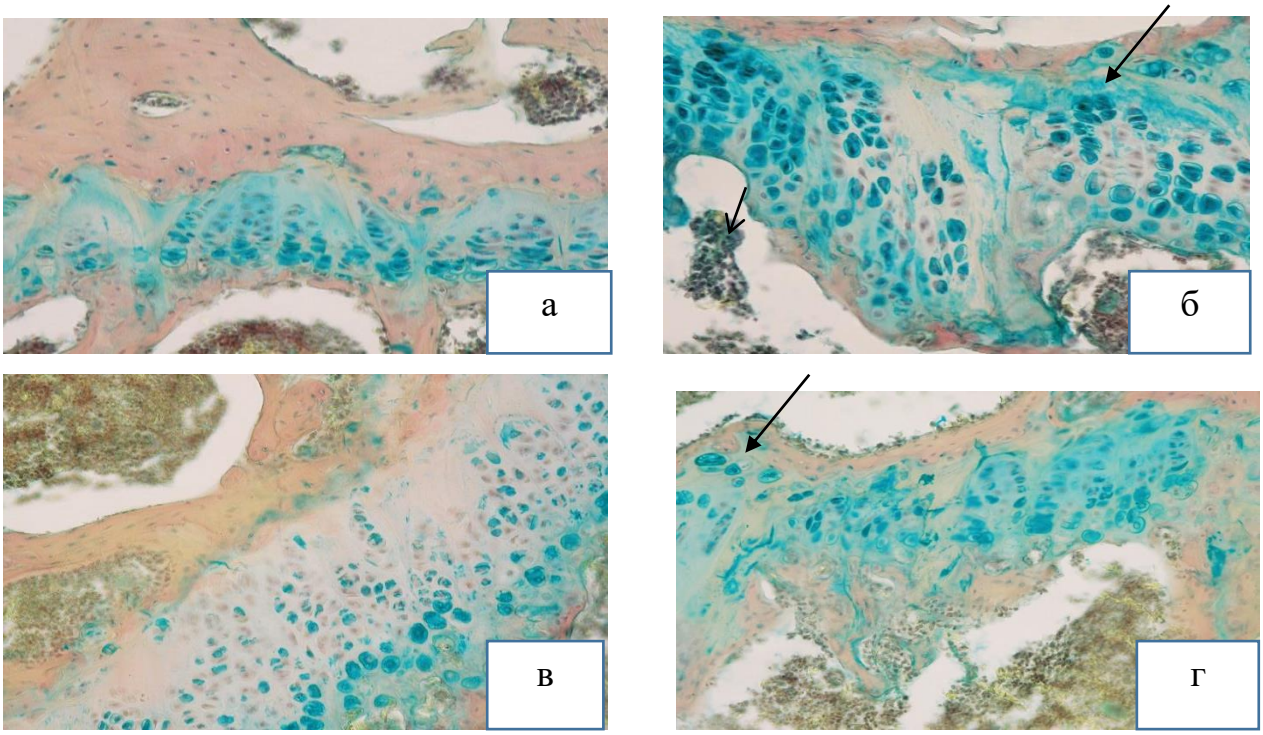


Рисунок 12. Структурні зміни метафізарної пластинки великогомілкової кістки щурів Фокальна дегенерація у зоні росту хряща метафаза (зона проліферації і гіпертрофії).

Примітка: ← зона дегенерації;

а – інтактний контроль; б – контрольна патологія;

в – контрольна патологія + гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, оваріоектомовані самки яким уводили гель з ресвератролом та гіалуроновою кислотою;

г – контрольна патологія + крем з проместріном, оваріоектомовані самки щурів яким уводили крем з проместріном.

Забарвлення альціановий синій, пікрофуксин об. 20, ок. 10.

Додаток С

ПАТЕНТ

ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 139105

ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ГІПОЕСТРОГЕНОВИХ СТАНІВ У ЖІНОК У ФОРМІ ГЕЛЮ ВАГІНАЛЬНОГО

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **26.12.2019.**

Заступник Міністра розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України Д.О. Романович

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ * ідентифікаційний код 37508596 *

Додаток D

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ:

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
Перший проректор
Дніпровського державного медичного університету
професор _____ І.С. Шпонька
«29» березня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати науково-дослідної роботи «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою».
2. **Установа розробник, її поштова адреса:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, кафедра фармакології, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Автор розробки:** д.мед.н., проф. Зайченко Г.В., PhD аспірант Стрига О.А.
4. **Джерела інформації:**
   1. Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 4 (1). - С. 21-30.
   2. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) / Г. В. Зайченко, Н. О. Карпенко, О. А. Стрига, О. С. Сініцина // Проблеми ендокринної патології. - 2018. - № 4. - С. 65-74.
   3. Іванюк, О.І., Ярних, Т.Г, Стрига, О.А, Зайченко, Г.В., Ковалевська, І.В. (26.12.2019 р.). «Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального». Патент України на корисну модель №139105
5. **Місце впровадження:** кафедра фармакології і клінічної фармакології Дніпровського державного медичного університету.
6. **Термін впровадження:** з «02» квітня 2020 р. по «22» березня 2021 р.
7. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використанні при формуванні методичного забезпечення дисципліни «Фармакологія».
8. **Використання розробки** показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.
   Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології і клінічної фармакології Дніпровського державного медичного університету, протокол № 9 від «26» березня 20 21 р.

Відповідальний за впровадження: викладач кафедри фармакології і клінічної фармакології, к. фарм.н. Курт-Аметова Г.С.

Зав. кафедри фармакології і клінічної фармакології
Дніпровського державного медичного університету
д.мед.н., професор В. І. Жилюк

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного університету
проф. І.П.Шмакова
«07» квітня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати науково-дослідної роботи «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою».
2. **Установа розробник, її поштова адреса:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, кафедра фармакології, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Автор розробки:** д.мед.н., проф. Зайченко Г.В., PhD аспірант Стрига О.А.
4. **Джерела інформації:**
   1. Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 4 (1). - С. 21-30.
   2. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) / Г. В. Зайченко, Н. О. Карпенко, О. А. Стрига, О. С. Сініцина // Проблеми ендокринної патології. - 2018. - № 4. - С. 65-74.
5. **Місце впровадження:** кафедра фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету.
6. **Термін впровадження:** з «15» березня 2021 р. по «07» квітня 2021 р.
7. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використанні при формуванні методичного забезпечення дисциплін
8. **Використання розробки** показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету, протокол № 5 від «07» квітня 2021 р.

Відповідальний за впровадження: доц. Лобашова К.Г.

Зав. кафедри фармакології та фармакогнозії
Одеського національного медичного університету
д.мед.н., професор Я. В. Рожковський

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. _____ А.Г. Шульгай
"__" _____ 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати науково-дослідної роботи «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою».
2. **Установа розробник, її поштова адреса:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, кафедра фармакології, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Автор розробки:** д.мед.н., проф. Зайченко Г.В., PhD аспірант Стрига О.А.
4. **Джерела інформації:**
   1. Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 4 (1). - С. 21-30.
   2. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) / Г. В. Зайченко, Н. О. Карпенко, О. А. Стрига, О. С. Сініцина // Проблеми ендокринної патології. - 2018. - № 4. - С. 65-74.
   3. Іванюк, О.І., Ярних, Т.Г, Стрига, О.А, Зайченко, Г.В., Ковалевська, І.В. (26.12.2019 р.). «Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального». Патент України на корисну модель №139105
5. **Місце впровадження:** кафедра фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету МОЗ України.
6. **Термін впровадження:** з «10» січня 2021 р. по «1» квітня 2021 р.
7. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використанні при формуванні методичного забезпечення дисципліни «Фармакологія».
8. **Використання розробки** показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету, протокол № _4 від «_2_» квітня_ 2021 р.

Зав. кафедри фармакології з клінічною фармакологією
Тернопільського національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
д.мед.н., професор О. М. Олещук

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного університету
проф. _____ І.М. Владимирова
«30» квітня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати науково-дослідної роботи «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою».
2. **Установа розробник, її поштова адреса:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, кафедра фармакології, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Автор розробки:** д.мед.н., проф. Зайченко Г.В., PhD аспірант Стрига О.А.
4. **Джерела інформації:**
   1. Фармакологічне обгрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. - 2017. - Вип. 4 (1). - С. 21-30.
   2. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) / Г. В. Зайченко, Н. О. Карпенко, О. А. Стрига, О. С. Сініцина // Проблеми ендокринної патології. - 2018. - № 4. - С. 65-74.
   3. Іванюк, О.І., Ярних, Т.Г, Стрига, О.А, Зайченко, Г.В., Ковалевська, І.В. (26.12.2019 р.). «Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального». Патент України на корисну модель №139105
5. **Місце впровадження:** кафедра фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету.
6. **Термін впровадження:** з « 28 » квітня 2021 р.
7. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень використанні при формуванні методичного забезпечення дисциплін
8. **Використання розробки** показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.
9. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету, протокол № 18 від «28» квітня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
проф. Кіреєв І.В.
доц. Жаботинська Н.В.
доц. Таран А.В.

Зав. кафедри фармакології та фармакотерапії
Національного фармацевтичного університету
д.мед.н., професор С. Ю. Штриголь

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з науково-педагогічної роботи ПВНЗ «Київський медичний університет» професор
професор С.І.Доан
"22" жовтня 2020р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати науково-дослідної роботи «Фармакологічне дослідження вагінального гелю комбінованого складу з ресвератролом та гіалуроновою кислотою».

2. Ким запропоновано, адреса виконавця: PhD аспірантом кафедри фармакології НМУ імені О.О. Богомольця Стрига О.А., просп. Перемоги, 34

3. Джерела інформації:

1. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на ос-нові ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – Вип. 4, Т. 1 (139). – С. 21-30.

2. Зайченко Г. В., Карпенко Н. О., Стрига О. А., Сініцина О. С. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) // Проблеми ендокринної патології – 2018 – №4 – С. 65-74

4. Де і коли було впроваджено: кафедра фармакології, клінічної фармакології, патологічної фізіології ПВНЗ «Київський медичний університет».

5. Строки впровадження: червень 2020 р. по червень2021р.

6. Загальна кількість спостережень: 3(спостережень).

7. Результати використання методу: з січень2020 р. по грудень 2020 р.
позитивні (кількість спостережень) - 3; негативні (кількість спостережень) - 0;
невизначені (кількість спостережень) - 0.

8. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації: Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на ос-нові ресвератролу / Г. В. Зайченко, Н. О. Горчакова, О. А. Стрига, О. І. Рубан // Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – Вип. 4, Т. 1 (139). – С. 21-30. Зайченко Г. В., Карпенко Н. О., Стрига О. А., Сініцина О. С. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури) // Проблеми ендокринної патології – 2018 – №4 – С. 65-74

9. Відмітки і пропозиції:

_____ немає _____

Зав. кафедри фармакології,
клінічної фармакології,
патологічної фізіології
ПВНЗ «Київський медичний університет»
академік АНВШ України,
д.мед.н., професор В.А. Туманов

«22» жовтня 2020року
(дата)

ПОСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР
КИЇВСЬКОГО МЕДИЧНОГО
УНІВЕРСИТЕТУ

Т. В. Гороховська