

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора Бєленічева Ігора Федоровича на дисертаційну роботу **МОВЧАН Олени Дмитрівни "Закономірності формування механізмів толерантності до дії антиконвульсантів"**, подану в спеціалізовану вчену раду Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 -фармакологія

Актуальність теми дисертації

Проблема фармакологічної резистентності епілепсії, незважаючи на появу безлічі «нових» антиепілептичних препаратів, залишається актуальною до теперішнього часу. Частка фармакорезистентності пацієнтів серед хворих на епілепсію не змінилася і становить близько 30%, як і 20 років тому. Існує кілька гіпотез, що пояснюють механізми формування фармакологічної резистентності. Гіпотеза мішеней, або таргетна гіпотеза, вказує на порушення функціонування мішеней антиконвульсантів, таких як вольтажзалежних іонних каналів та рецепторів нейротрансмітерів. Це відбувається внаслідок мутацій в генах, що кодують потенціалзалежні іонні канали: Na⁺-канали кодуються генами SCN1A, SCN2A, SCN1B; K⁺-канали-генами KCNQ2, KCNQ3; Cl⁻-канали - геном CLCN2, а також лігандзалежні іонні канали, що мають у своїй структурі рецептори ГАМК - генами GABRG1, GABRG2. Наступний патогенетичний механізм формування резистентності епілепсії - це порушення засвоєння мозком антиконвульсантів, або гіпотеза лікарських транспортерів. Це так звана первинна лікарська резистентність. Вторинна резистентність, або толерантність, формується у процесі тривалого застосування лікарського засобу і є по суті викликаним синдромом, що сформувався внаслідок тривалого вживання лікарського засобу і може бути пов'язана з патогенезом епілепсії, що індукує каскад молекулярно-біохімічних реакцій.

Ось чому дослідження проблеми толерантності до дії протисудомних засобів має не тільки теоретичний інтерес, але й лежить у площині практичної розробки підходів підвищення ефективності лікування епілепсії, наразі її фармакорезистентних форм. Таким чином, актуальність даної роботи на сучасному етапі безсумнівна і обумовлена, в першу чергу, відсутністю в арсеналі сучасного лікаря високоефективної схеми лікування епілепсії, наразі її фармакорезистентних форм.

Дисертаційна робота виконана у розрізі планових наукових тем ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ» «Дослідження розвитку терапевтичної резистентності до протисудомних засобів при їх тривалому застосуванні» (№ держреєстрації 0106U000867) та «Міжпівкульна нейропсихофармакологія: домінантна ліво-правопівкульна дія протиепілептичних засобів» (№ держреєстрації 0111U002467).

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

Визначення закономірностей механізмів розвитку толерантності до протисудомної дії антиконвульсантів при їх тривалому введенні проводили за кількома етапами. Вивчали закономірність розвитку толерантності до дії протисудомних засобів при їх тривалому введенні. Досліджували можливість формування перехресної толерантності між фенобарбіталом, карбамазепіном, вальпроатом натрію, топіраматом та ламотриджином. Визначали протисудомну активність кожного антиконвульсantu, введенного на тлі сформованої толерантності до нього, у дозі, що на 50 % перевищує його початкову протисудомну дію. Досліджували фармакодинамічні механізми розвитку толерантності до дії досліджуваних антиконвульсантів. Встановлювали фармакокінетичні особливості фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, топірамату та ламотриджину на тлі сформованої толерантності до їх протисудомної дії. Визначали підходи раціонального застосування протисудомних препаратів при лікуванні фармакорезистентної епілепсії. В результаті проведених досліджень встановлено, що при

тривалому введенні фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, ламотриджину і топірамату формується толерантність до їх протисудомної дії. Встановлено наявність перехресної толерантності між вказаними антиконвульсантами. При цьому виявлені як загальні закономірності розвитку толерантності відносно всіх досліджуваних антиконвульсантів, так й індивідуальні відмінності в цьому плані для кожного протисудомного препарату. Пов'язано це з особливостями механізмів дії окремих антиконвульсантів і з своєрідністю їх метаболізму, опосередкованого у першу чергу ферментативною системою Р-450. Отримані у цьому напрямку дані підтверджують вказані положення і експериментально обґрунтовують практичні рекомендації щодо конкретних підходів подолання терапевтичної резистентності при лікуванні різних клінічних форм епілепсії. Наведені методики є загальноприйнятими в рамках поставлених завдань, в достатній мірі відображають високий рівень досліджень. Проаналізовано і зареферовано велику кількість наукової літератури та медичних джерел (274 джерела інформації, з них 106 – кирилицею та 168 – латиницею).

У роботі використано достатню кількість для достовірного аналізу лабораторних тварин (1100 нелінійних білих мишей – самців та самиць та 192 статевозрілих нелінійних білих щурів-самців). Переконливі результати з адекватним використанням методів статистичної обробки зумовили високу статистичну значущість, на основі яких дисертант обґрунтував положення, висновки та практичні рекомендації.

Все це однозначно свідчить, що висунуті автором наукові положення і висновки досить обґрунтовані, достовірні, впливають з проаналізованого фактичного матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані. Практичні рекомендації прості та конкретні.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертаційна робота Мовчан О.Д. являє собою дослідження, в якому вперше встановлено, що на моделях хемоконвульсантних судом, які

асоціюються з малими клінічними формами епілепсії, толерантність до протисудомної дії фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, топірамату та ламотриджину при їх тривалому введенні формується швидше, ніж на моделях електроіндукованих судом, які екстраполюються на генералізовані судомні стани. Вперше встановлено, що формування толерантності до антиконвульсантів пов'язано також з виявленими фармакокінетичними особливостями протисудомних препаратів при їх тривалому введенні. У певній мірі ці зміни обумовлені зрушеннями в активності системи ферментів Р-450. Вперше визначені фармакодинамічні механізми розвитку толерантності, які полягають у змінах функціонування, головним чином, ГАМК-ергічної передачі, що призводить до зниження активності гальмівної ланки нейрофізіологічних процесів і зменшення або нівелювання протисудомної дії антиконвульсантів.

Наукова новизна роботи підтверджена Інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я «Раціональне застосування антиконвульсантів у лікуванні фармакорезистентної епілепсії» (№ 315-2012).

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

Отримані результати науково обґрунтовані та мають важливе теоретичне і практичне значення. Впровадження їх буде сприяти підвищенню ефективності лікування різних клінічних форм епілепсії. Встановлений більш швидкий розвиток толерантності до протисудомних засобів при лікуванні малих форм епілепсії. Досліджена перехресна толерантність між фенобарбіталом, карбамазепіном, вальпроатом натрію та топіраматом, яка призводить до зниження або відсутності терапевтичного ефекту. При лікуванні генералізованих судомних станів за умов розвитку толерантності до фенобарбіталу показано призначення карбамазепіну або ламотриджину. Доведено, що підвищення дози протисудомних препаратів для подолання терапевтичної резистентності не призводить до очікуваного

лікувального ефекту і може сприяти посиленню токсичної дії протисудомних засобів.

Матеріали дисертації можуть бути використані в науковій роботі, навчальному процесі та практичній лікарській діяльності.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за темою дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових робіт, з них 8 статей у наукових фахових виданнях, в т.ч. 1 зарубіжна, 1 інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я, 6 тез у матеріалах з'їздів, конгресів, науково-практичних конференцій.

Всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації знайшли своє відображення у друкованих роботах. Аналіз основного змісту опублікованих робіт дозволяє зробити висновок, що всі наукові положення, висновки та практичні рекомендації, представлені в дисертації, відображені в опублікованих працях.

Рекомендації щодо використання результатів та висновків

Дані досліджень, отримані у рамках виконання дисертаційної роботи, можуть бути використані в науковій, навчальній та лікувальній роботах науково-дослідних установ і медичних ВНЗів та інших медичних закладів.

Обсяг і структура дисертації

Оцінюючи зміст дисертації, слід зазначити, що робота легко читається і сприймається, виклад основних результатів дослідження компактний та конкретний.

Робота побудована в традиційному стилі та складається з вступу, огляду літератури, характеристики матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, обговорення результатів дослідження -

заклучення, висновків, списку використаних літературних джерел, який включає 106 роботи кирилицею та 168 джерел латинським шрифтом.

Огляд літератури докладний і структурований, автором чітко охарактеризовані невивчені на сьогоднішній день або сумнівні аспекти, що стосуються класифікації клінічних форм епілепсії, принципів фармакотерапії епілепсії, класифікації протиепілептичних засобів та механізмів їх дії, терапевтичної резистентності до дії антиконвульсантів. Аналіз літератури показав, що антиконвульсанти, які застосовуються при епілептичних нападах, чинять симптоматичний вплив на перебіг захворювання, і проблема фармакотерапії ускладнюється ще й тим, що до протиепілептичних засобів можливе формування терапевтичної резистентності. Загальновизнані положення щодо причин розвитку толерантності до дії антиконвульсантів відсутні. Також вкрай обмежені експериментальні відомості у цьому напрямку. Можливо, це пов'язано зі складністю моделювання епілептичних розладів, адекватних клінічним проявам епілепсії. У розділі «матеріали і методи дослідження» автором приведений дизайн дослідження, вказані вид лабораторних тварин (білі безпородні щури та миші), джерело їх отримання, умови утримання. Всі експериментальні процедури проводили відповідно до правил «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» (1986), «Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях» (1989). В експериментах використані відомі лікарські засоби, які вивчались в терапевтичних дозах для тварин згідно літературних даних: Карбамазепін, Вальпроат натрію, Ламотриджин, Топірамат, Фенобарбітал. Охарактеризовані експериментальні моделі епілепсії. У роботі використовувались найбільш адекватні клінічним проявам епілепсії моделі – максимальний електрошок, пентилентетразолові (коразолові) конвульсії, тіосемікарбазидні судоми. Дослідження розвитку терапевтичної резистентності до основних протиепілептичних препаратів проводили на білих мишах з використанням різних хемоконвульсантів та максимального

електрошоку. Дослідження перехресної толерантності проводили на білих мишах при застосуванні аналізаторів коразолу, тіосемікарбазиду, а також максимального електрошоку. Критерієм оцінки появи перехресної толерантності на препарат вважали відсутність захисту тварини від нападу клонічних, тонічних судом та летальності. Для кількісної оцінки інтенсивності судомного нападу та оцінки протиепілептичної дії лікарських препаратів дисертант застосовував широко використовувану в експериментальній фармакології 5-бальну шкалу, узявши за основу ряд критеріїв, в тому числі тривалість латентного періоду розвитку перших судомних проявів (посмикування, стрибки), кількість тварин, у яких розвивався розгорнутий клоніко-тонічний напад, летальність. Протисудомним впливом вважали захист тварин від розвитку клонічних, тонічних судом, летальності. Фармакокінетичні механізми розвитку толерантності досліджувалися за показниками зміни рівня досліджуваних антиконвульсантів у крові та мозку толерантних тварин і функціонування системи цитохрома Р-450. Концентрацію активної субстанції препаратів визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за допомогою хроматографічної системи Agilent Technologies 1200 LC/MS system (США) з ультрафіолетовим і мас-спектрометричним детектором. Детектування здійснювали одноквадрупольним мас-спектрометром з електроспрей-іонізацією. Для з'ясування участі системи ізоферментів Р-450 у механізмі розвитку толерантності до досліджуваних препаратів застосовували барбітуратний (гексеналовий) сон. Для статистичного аналізу отриманих результатів, математичного розрахунку ефективної дози досліджуваних сполук, оцінки їх токсичності дисертант застосовував сучасний пакет комп'ютерних програм. У розділі 3 власних досліджень показано, що тривале введення антиконвульсантів (фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, топірамату і ламотриджину) призводить до розвитку толерантності до їх протисудомної дії. Також виявлено, що на моделях хемоконвульсантних судомних станів толерантність до дії

фенобарбіталу наступає в 2-3 рази швидше відносно вальпроату натрію, карбамазепіну і топірамату. При дослідженні хемоконвульсантних моделей судом розвиток толерантності до дії антиконвульсантів реєструється в 2-3 рази швидше, ніж при електроіндукованій моделі судомних станів. У розділі 4 поданої на рецензію роботи на моделях хемоконвульсантних судомних станів (коразол, тіосемікарбазид) встановлена наявність прямої і перехресної толерантності до протисудомної дії фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію і топірамату. А на електроіндукованій моделі судомних нападів (максимальний електрошок) не виявлено перехресної толерантності між фенобарбіталом, ламотриджином і карбамазепіном. У розділі 5 приведено результати експериментальних досліджень, якими показано, що підвищення доз фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію і топірамату на 50% відносно ефективних протисудомних доз у нетолерантних тварин не попереджують розвиток судомного синдрому у толерантних тварин. Також виявлено, що підвищення доз антиконвульсантів, до яких розвинулась толерантність, з метою подолання терапевтичної резистентності не сприятиме підвищенню ефективності фармакотерапії малих клінічних форм епілепсії. У розділі 6 показано, що одноразове введення антиконвульсантів (фенобарбіталу, карбамазепіну, вальпроату натрію, топірамату, ламотриджину) в протисудомних дозах інтактним тваринам попереджує розвиток ефектів аналізаторів функціонування ГАМК-, гліцин-, глутамат- і серотонінергічної систем мозку (коразолу, пікротоксину, бікукуліну, тіосемікарбазиду, стрихніну, каїнової кислоти і резерпіну). Виявлено, що у толерантних тварин нівелюється протисудомна активність досліджуваних антиконвульсантів при введенні ГАМК-ергічних хемоконвульсантів рецепторно-біохімічної дії (коразол, пікротоксин, бікукулін, тіосемікарбазид). Антирезерпінова дія фенобарбіталу і вальпроату натрію у толерантних тварин не відтворюється, що свідчить про участь серотонінергічної системи у формуванні терапевтичної резистентності до вказаних протисудомних препаратів. В результаті проведених експериментів

з використанням специфічних аналізаторів стрихніну і каїнової кислоти не було виявлено відмінностей у функціонуванні гліцин- і глутаматергічної систем при порівнянні груп нетолерантних і толерантних тварин при дії фенобарбіталу і карбамазепіну. У розділі 7 на основі проведених сучасних фармакокінетичних досліджень встановлено, що толерантність до дії антиконвульсантів формується на тлі змін у вмісті цих препаратів у крові і мозку тварин. Вміст депакіну і карбамазепіну у крові і мозку толерантних тварин практично не визначається. При цьому обидва препарати, причому це особливо виражено у депакіна, проявляють властивості індукторів Р-450, що пояснює причину зниження рівня препаратів у тканинах мозку і як наслідок припинення їх протисудомної дії.

Кількість фенобарбіталу і ламотриджину у крові і мозку толерантних тварин зростає і це відбувається, незважаючи на те, що обидва препарати проявляють властивості індуктора Р-450. Отже, у даному випадку мова йде про ефект кумуляції фенобарбіталу і ламотриджину, що не попереджує розвиток толерантності до їх дії. Топірамат проявляє властивості інгібітора Р-450, що може бути причиною підвищення рівня препарату у мозку толерантних тварин. Застосований метод статистичного аналізу дав змогу правильно інтерпретувати експериментальні дані і зробити обґрунтовані висновки.

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

Висновки дисертації логічно випливають з результатів дослідження і повністю відповідають положенням, які були сформульовані в меті та завданні дослідження. Фактичний матеріал добре систематизовано. Робота написана чіткою науково-літературною мовою, список літератури складається, головним чином, із сучасних наукових джерел.

Зауваження:

1. В розділі «Матеріали та методи...» відсутній підрозділ, який схематично та текстово відображує дизайн дослідження.
2. В розділі «Матеріали та методи...» не представлений розподіл тварин за групами.
3. Не проведене експериментальне визначення ED_{50} або теоретичне обґрунтування ефективної дози сполук, що досліджуються, для кожного скринінгового тесту.
4. Вживаність тварин з модельною епілепсією більш правильним було б розраховувати за методом Каплана-Мейєра з розрахунком кумулятивного критерію виживання.
5. Не зазначено, яку частину головного мозку (кору, мозочок, стовбур) використовували при проведенні досліджень з фармакокінетики і як її виділяли.
6. В роботі використовувались неселективні агоністи/антагоністи глутаматних, ГАМК і гліцинових рецепторів, які не дають можливості достатньо достовірно оцінити отримані результати.
7. У розділі 7 перед проведенням фармакокінетичних досліджень доцільним було б проведення комп'ютерного аналізу молекулярної структури та прогнозування здатності антиконвульсантів долати ГЕБ (QSAR-аналіз здатності препаратів проникати крізь ГЕБ на підставі площі поверхні проникнення ($\log PS$) та QSAR-аналіз нейродоступності ($\log BB$).

Ці зауваження і побажання не є принциповими, не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи та загальну позитивну оцінку дисертації, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

У рамках дискусії хотілося б отримати відповіді на такі питання:

1. Відомо, що активні форми кисню та азоту відіграють певну роль у формуванні первинної резистентності до антиконвульсантів, приводячи до

окислювальної модифікації рецепторів та іонних каналів. Які, на Ваш погляд, ланки - мішені для антиоксидантної корекції АФК-залежних механізмів формування лікарської резистентності можна намітити? Які групи антиоксидантів, враховуючи їх молекулярно-біохімічні механізми дії, необхідно включати в комплексну терапію фармакорезистентності форм епілепсії?

2. Базуючись на отриманих Вами експериментальних даних, як Ви вважаєте, якою є роль аміноспецифічної системи мозку та її компонентів в механізмах формування вторинної лікарської резистентності?
3. Як Ви вважаєте, які механізми будуть залучені до формування фармакорезистентних форм епілепсії при модуляції етанолом бар'єрних функцій ГЕБ, а також при хронічних хворобах печінки? Які можна намітити шляхи корекції цих патологічних процесів?

Висновки

Дисертація Мовчан Олени Дмитрівни за темою: "Закономірності формування механізмів толерантності до дії антиконвульсантів" є самостійним, закінченим науковим дослідженням, в якому сформульовано і обґрунтовано наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як нове розв'язання важливого наукового завдання. За актуальністю, об'ємом, використанням методів досліджень, новизною отриманих даних дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а дисертантка заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Завідувач кафедри фармакології та
медичної рецептури
Запорізького державного медичного
університету, д.біол. н., професор



Завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури
Підтверджую
Знач. відділу кадрів Запорізького
державного медичного університету
20 р. Підпис