

ВІДГУК

офіційного опонента д.мед.н., професора Антоненка Петра Борисовича на дисертацію Шаяхметової Ганни Михайлівни «Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції (експериментальне дослідження)», подану до спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» для здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю фармакологія –

14.03.05

Заважаючи на значну поширеність (понад 60 нових випадків на 100 000 населення) туберкульоз дотепер залишається важливою медико-соціальною проблемою в Україні. Важливим фактором покращення ефективності його лікування є своєчасна діагностика і корекція небажаних ефектів протитуберкульозних препаратів. Зважаючи на середній вік хворих на туберкульоз, більшість з яких є особами репродуктивного віку, важливе місце посідає гонадотоксична дія протитуберкульозних препаратів. Водночас літературні дані щодо впливу протитуберкульозної хіміотерапії на репродуктивну систему є нечисленними і неповними. Відомо, що розвиток побічної дії протитуберкульозних засобів може залежати від ряду причин. Серед них особливе місце посідає цитохром P-4502E1 (CYP2E1), індукція якого супроводжується утворенням токсичних метаболітів. Однак попередні клінічні випробування не дають повної інформації про небажані побічні реакції за участю CYP2E1, оскільки у дослідженнях були відсутні пацієнти з коморбідними захворюваннями.

Наукова робота Шаяхметової Г.М. присвячена вирішенню **актуальної** проблеми сучасної фармакології, яка полягає в вивченні механізмів побічної дії протитуберкульозних препаратів та шляхів її фармакологічної корекції. У цьому напрямку увага дисертанта прикута до встановлення впливу протитуберкульозних препаратів I ряду на репродуктивну функції щурів-самців, як за умов самостійного, так і комбінованого використання, а також на тлі станів, що супроводжуються індукцією CYP2E1. Також обґрунтовується гонадопротекторна ефективність метаболітних препаратів, що містять метіонін.

Актуальність дисертаційної роботи Шаяхметової Г.М. також підтверджується й тим, що вона є частиною планової науково-дослідної роботи

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за темою: «Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у печінці та гонадах самців щурів» (№ держреєстрації 0107U000393) та «Механізми гепато- та гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі (експериментальне дослідження)» (№ держреєстрації 0110U001219). Дисертант є співвиконавцем зазначених тем.

Обсяг та структура дисертації. Представлена дисертація оформлена згідно вимог, побудована за традиційною схемою і складається із анотацій двома мовами (українською та англійською), вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 6 розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел (646 назв, з яких 60 – кирилицею, 586 – латиною) та додатків. Роботу викладено на 416 сторінках, ілюстровано 55 таблицями та 68 рисунками.

Основний зміст дисертації та його оцінка. Вступ відзначається загальноприйнятим порядком представлення матеріалу. На початку вступу автор обґрунтовує актуальність обраної теми, про що свідчать численні посилання на сучасні джерела літератури, які свідчать про значну частоту розвитку побічних ефектів протитуберкульозних препаратів, включаючи ураження репродуктивної функції у хворих. У вступі чітко сформульовані мета та завдання дослідження, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів. Наведено дані щодо публікацій та апробації результатів дослідження.

Огляд літератури дисертаційної роботи «Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції (експериментальне дослідження)» складається із 3 підрозділів. В першому підрозділі огляду представлена сучасна інформація щодо сучасних протитуберкульозних препаратів I ряду, їх побічних ефектів та впливу на ферментативну активність системи CYP-450 людини. В наступному підрозділі дисертант досліджує дані щодо впливу зовнішніх (алкогольна інтоксикація) і внутрішніх (цукровий діабет) на чоловічу репродуктивну систему. Третій підрозділ огляду літератури присвячено можливостям і наслідкам фармакологічної модифікації активності ферментів системи CYP-450, особливо CYP2E1.

У розділі «**Матеріали та методи дослідження**» наведено принципи розподілу тварин на різних етапах дослідження з деталізацією режиму введення

протитуберкульозних препаратів I ряду (ізолювано або у комбінації). На перших двох етапах протитуберкульозні препарати вводились інтактним тваринам, на третьому і четвертому – вводились після формування експериментальної патології – хронічного алкоголізму і стрептозотоцинового цукрового діабету відповідно. В розділі детально вказано методи дослідження репродуктивної функції щурів-самців; біохімічні, молекулярно-біологічні та гістохімічні методи; комп'ютерне моделювання взаємодії лікарських препаратів з ферментом CYP2E1. Також вказано дані реєстрації та виготовлення протимікробних препаратів, хімічних і молекулярно-біологічних реагентів використаних в дослідженні. Дослідження проводились згідно відповідного Закону України та Директиви Ради Європейських Співтовариств, а також були затверджені комітетом з біоетики Інституту фармакології та токсикології НАМН України. Матеріали, моделі та методи, використані в роботі, дозволяють об'єктивно та змістовно вирішити її завдання та досягти поставленої мети. Автором використано низку статистичних методів, які дозволяють зробити ґрунтований висновок щодо вірогідності досліджених змін.

Результати власних досліджень наведені автором в шести розділах.

У третьому розділі дисертації автором представлено дані щодо впливу ізолюваного і комбінованого введення протитуберкульозних препаратів I ряду на сперматогенез і стероїдогенез в сім'яниках щурів. На основі представлених даних автором зроблено висновок щодо пригнічення синтезу тестостерону, морфологічні порушення у сперматогенному епітелії, зниження утворення і активності сперматозоїдів як на тлі окремого монотерапії протитуберкульозних препаратів, так і за умов їх комбінації. Зазначені зміни супроводжувались зростанням ризику внутрішньоутробної загибелі плодів. Найбільш токсичним препаратом виявився етамбутол і комбінація протитуберкульозних препаратів.

У Розділі 4 дисертантом проведено дослідження молекулярно-біологічних та біохімічних показників сім'яників за умов ізолюваного та комбінованого введення протитуберкульозних препаратів. Відповідно до представлених даних автор робить висновок про здатність протитуберкульозних препаратів, особливо ізоніазиду і етамбутолу викликати індукцію CYP2E1, фіксує порушення про- та антиоксидантного статусу і посилення фрагментації ДНК в сім'яниках.

У Розділі 5 наведено результати порівняння морфологічних, біохімічних, функціональних змін в сім'яниках щурів після введення комбінації I

(ізоніазид+рифампіцин+піразинамід+етамбутол) з аналогічними показниками після введення комбінації 2 (аналогічний склад до комбінації 1 з заміною етамбутолу на стрептоміцин). Автором переконливо показано, що заміна етамбутолу на стрептоміцин зменшує морфологічні зміни в сім'яниках щурів, знижує процеси ПОЛ, водночас експресія гену *CYP2E1* і інтенсивність апоптозу залишилась практично без змін.

Розділі 6 присвячено впливу хронічної алкоголізації щурів окремо або у поєднанні з протитуберкульозними препаратами на морфо-функціональний і біохімічний стан сім'яників, розвиток потомства, експресію гену *CYP2E1*. Представлені дані засвідчили розвиток морфо-функціональних і біохімічних порушень в сім'яниках, посилення експресії гену *CYP2E1*, що призводило до порушення сперматогенезу, зростанню ризику внутрішньоутробної загибелі потомства щурів при хронічному вживанні етанолу, особливо на тлі протитуберкульозних препаратів.

У **Розділі 7** наведено дані впливу ізолюваного експериментального цукрового діабету та поєданого з протитуберкульозними препаратами на морфо-функціональний стан сім'яників, розвиток потомства, молекулярно-біологічні та біохімічні показники печінки та сім'яників у щурів. Автором експериментально доведено, що введення протитуберкульозних препаратів I ряду на тлі цукрового діабету призводить до морфо-функціональних порушень сім'яників, збільшення постімплантаційної смертності ембріонів, зростання експресії гену *CYP2E1*, посилення процесів ПОЛ в сім'яниках щурів.

Розділ 8 присвячений впливу препаратів метіонін і Метовітан, які є інгібітором експресії гену *CYP2E1*, на репродуктивну функцію щурів-самців. З'ясувалось, що курсове введення метіоніну і особливо комплексного препарату Метовітан нормалізує сперматогенез, усуває порушення балансу про- і протиоксидантних систем в сім'яниках щурів під час застосування протитуберкульозних препаратів I ряду.

Аналіз та узагальнення отриманих результатів викладено згідно до послідовності розділів дослідження. Цей розділ підбиває підсумки дослідження і співвідносить отримані дані з літературними даними. Чіткий стиль викладення і обговорення власних результатів, об'ємний і глибокий аналіз сучасної наукової літератури дозволив дисертанту зробити науково обґрунтовані **висновки**, які відповідають поставленій меті і завданням дисертаційної роботи.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і

рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Експериментальні дані отримано на підставі порівняння груп щурів з ізолюваним введенням протитуберкульозних препаратів (ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду, етамбутолу, стрептоміцину) з групою, яка отримувала комбінацію протитуберкульозних препаратів і контрольною групою. Додатково формувались групи експериментальної модифікації гену *CYP2E1* на прикладі хронічної алкоголізації і стрептозотоцинового цукрового діабету, а також фармакологічної корекції метіоніном і Метовітаном. Всі групи містять достатню кількість досліджених тварин. В роботі використано сучасні фармакологічні, токсикологічні, біохімічні, молекулярно-біологічні, морфологічні методи, а також адекватні статистико-математичні методи обробки даних. При вивченні сучасного стану проблеми та аналізі отриманих даних застосовано достатній обсяг джерел вітчизняної та зарубіжної літератури. Наукові положення, висновки та практичні рекомендації повністю науково обґрунтовані, є статистично вірогідними і логічно витікають із отриманих фактичних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів є безумовною. Автором уперше показано, що протитуберкульозні препарати I ряду за умов сумісного курсового введення викликають морфо-функціональні порушення у сім'яниках, збільшують внутрішньоутробну смертність потомства, пригнічують сперматогенез, порушують баланс про- і антиоксидантної системи. У значній мірі вказані ефекти реалізуються шляхом індукції гену *CYP2E1*. Вперше доведено, що застосування протитуберкульозних препаратів на тлі хронічної алкоголізації щурів і стрептозотоцинового цукрового діабету посилює ступінь ушкодження сперматогенезу, спричиняє порушення морфо-функціонального і біохімічного стану сім'яників, що асоціюється з підвищенням експресії мРНК та протеїну *CYP2E1*. Встановлено, що заміна етамбутолу на стрептоміцин у комбінації протитуберкульозних препаратів, а також застосування препаратів – ймовірних інгібіторів *CYP2E1* зменшує ступінь морфо-функціональних, біохімічних і молекулярно-генетичних зсувів, що виникають під час застосування протитуберкульозних препаратів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати експериментально встановили роль *CYP2E1* в розвитку гонадотоксичної дії, яку спричиняють протитуберкульозні препарати. Проведені дослідження засвідчили ефективність заміни препарату етамбутолу на стрептоміцин в комплексній хіміотерапії туберкульозу, а також дієвість призначення ймовірних інгібіторів

CYP2E1, що значно зменшує гонадотоксичну дію протитуберкульозних препаратів I ряду.

Результати досліджень впроваджено в педагогічний процес та наукові дослідження кафедр фармакології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», ДЗ «Луганський державний медичний університет МОЗ України, Національного фармацевтичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Харківського національного медичного університету, Запорізького державного медичного університету, відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, кафедр фармацевтичної хімії і кафедри фізіології людини та тварини Одеського національного університету ім. І.І.Мечникова.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих роботах і в авторефераті. Матеріали дисертаційної роботи у повній мірі відображені у 56 опублікованих роботах: 30 статей у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (з них 16 у закордонних наукометричних наукових виданнях, що цитуються в тому числі і в базі Scopus), 3 інформаційних листа про нововведення в системі охорони здоров'я. Основні положення дисертації оприлюднені на 23 наукових форумах різного рівня, в тому числі на міжнародних з'їздах та конференціях.

Автореферат за змістом відповідає суті дисертації, в ньому подано головні її положення.

Недоліки дисертації та автореферату по їх змісту та оформленню. Істотних недоліків в дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Дисертаційна робота написана логічно, згідно існуючих вимог. Разом з тим, виникли деякі зауваження.

1. Терміни «множинно лікарсько-стійкі» і «широко лікарсько-стійкі» (стор. 45) стосовно штамів *M.tuberculosis* краще було б замінити на більш вживані «мультирезистентні» (multi-resistant) і «з розширеною резистентністю» (extended resistant) штами.

2. Висновок про те, що «генетичний поліморфізм основного метаболізуючого ізоніазид ензиму – N-ацетилтрансферази не впливає на прояви гепатотоксичності даного лікарського препарату» в огляді літератури (стор. 48) є досить суперечливим, оскільки існує багато досліджень, в тому числі проведених в Україні, які підтверджують зворотне. Згідно цих даних, ризик

гепатотоксичності під час застосування ізоніазиду вищий у носіїв генотипу «повільних ацетиляторів», ніж у «швидких ацетиляторів».

3. На стор. 53-54 препарат етамбутол характеризується як «синтетичний антибіотик». Більш вдалим було б назвати етамбутол «синтетичним протитуберкульозним» або «синтетичним антимікробним» препаратом, оскільки за визначенням антибіотики – це органічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами.

4. Не зовсім коректно називати реакцію зв'язування ксенобіотиків з глутатіоном в печінці прикладом третьою фазою детоксикації (стор. 57), оскільки широко визнаним є належність вказаної реакції до II фази біотрансформації ксенобіотиків (кон'югації або біосинтетичної фази).

5. В розділі 7 часто використовуються терміни «стрептозотоциновий діабет» або просто «діабет» при цьому опускається важливе уточнення, що мова йде про «цукровий діабет» (diabetes mellitus), оскільки існує ще і нецукровий діабет (diabetes insipidus).

Сильною стороною роботи є використання величезного об'єму відповідних закордонних посилань. З іншого боку, бажано було б більш повно відобразити результати наукових досліджень вітчизняних науковців – зокрема і впливу генетичного поліморфізму ферментів різних стадій біотрансформації – NAT2, GST – на розвиток побічних ефектів під час лікування туберкульозу.

Подібні зауваження та пропозиції принципово не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

В якості дискусії хотілося б почути відповідь дисертанта на наступні питання:

1. Відомо, що деякі протитуберкульозні препарати є інгібіторами різних ферментів родини CYP450, інші, навпаки, є індукторами. Як можна пояснити однакову спрямованість дії різних протитуберкульозних препаратів щодо експресії CYP2E1?

2. Як можна пояснити тенденцію до збільшення маси приплоду у щурів з хронічним вживанням алкоголю і стрептозотоцинового цукрового діабету?

3. Наскільки біотрансформація лікарських препаратів в тканинах поза печінкою може впливати на рівень препаратів в крові під час їх застосування?

ВИСНОВОК

Дисертація Шаяхметової Ганни Михайлівни «Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції (експериментальне дослідження)» є самостійним закінченим дослідженням, в якому обґрунтовані наукові положення, що в сукупності вирішують актуальне завдання сучасної фармакології – зменшення побічної дії протитуберкульозної хіміотерапії. За актуальністю, науковою новизною та практичним значенням дисертаційна робота відповідає чинним вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року (зі змінами), а дисертант Шаяхметова Г.М. заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю фармакологія - 14.03.05.

Офіційний опонент:

професор кафедри загальної та
клінічної фармакології

Одеського національного медичного
університету МОЗ України,

д.мед.н, професор



П.Б.Антоненко

Підпис д.мед.н., професора П.Б. Антоненка засвідчую.

Вчений секретар Одеського національного медичного
університету МОЗ України.

д.мед.н., професор



Р.С.Вастьянов