

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Шаяхметової Ганни Михайлівни: «Особливості реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів на чоловічу репродуктивну функцію та обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції (експериментальне дослідження)», подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія

Актуальність теми дисертації

Туберкульоз - серйозна медико-біологічна і соціальна проблема багатьох країн світу. На сьогодні кількість хворих на туберкульоз у світі становить близько 60 мільйонів. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) до 2020 року кількість інфікованих паличкою Коха може досягти 2 мільярдів. Існують особливості лікування пацієнтів з туберкульозом, які істотно впливають на його результативність, серед яких особливе місце займають резистентність мікобактерій до ЛЗ і важкі побічні реакції. Проблема туберкульозу з множинною та широкою лікарською стійкістю «розширила» список лікарських засобів, що використовуються в терапії туберкульозу, і в настанові ВООЗ з програмного ведення стійкого до ліків туберкульозу (2007) протитуберкульозні препарати були розділені на наступні групи: найбільш ефективні препарати (ізоніазид, рифампіцин), препарати помірної ефективності (антибіотики - стрептоміцин, канаміцин, флориміцин, фторхінолони, циклосерин і синтетичні препарати - етамбутол, етіонамід, протіонамід, піразинамід), менш ефективні препарати (ПАСК тибон (тіоацетазон). Крім того, існує ще інша класифікація: препарати першої лінії - ізоніазид, рифампіцин, стрептоміцин, піразинамід і етамбутол; препарати другої лінії - етіонамід, циклосерин, капреоміцин і канаміцин; альтернативні препарати - рифабутин, амікацин, ципрофлоксацин і офлоксацин. В останні роки з'явилися два нових протитуберкульозних засоба - перхлозон і бедаквілін. Однією з причин неефективного лікування (відриву від лікування) є відмова хворих від продовження лікування внаслідок

розвитку небажаних реакцій на протитуберкульозні препарати. Самі хворі часто мають низький рівень соціальних прагнень і нестійку установку на продовження лікування. У зв'язку з цим можна з визначеним ступенем впевненості говорити про роль побічних реакцій у формуванні туберкульозу з множинною лікарською стійкістю мікобактерій. В даному контексті проблема небажаних реакцій у фтизіатрії перестає бути тільки медичною проблемою, вона стає соціально-економічною проблемою. Тому знання клінічних проявів побічних реакцій на протитуберкульозні препарати - одна з умов раціональної хіміотерапії, профілактики побічних реакцій, а також їх усунення. Частота розвитку побічних ефектів етіотропної терапії при туберкульозі коливається від 13-17%% до 62-65%%. Такий широкий діапазон пояснюється відмінністю досліджуваних груп за соціальним і епідеміологічним статусом, наявністю супутніх ендокринних захворювань, зокрема, цукрового діабету, хронічним зловживанням алкоголю. Особливу увагу слід звертати на так звані групи ризику розвитку побічних реакцій. В першу чергу, це хворі з поширеними, полідеструктивними гостропрогресуючими формами туберкульозу. У таких випадках захворювання супроводжується розвитком гіпоксії, вираженого інтоксикаційного синдрому, які згубно впливають на функціонування різних органів і систем і створюють фон для розвитку побічних реакцій. Безсумнівно, негативний внесок в розвиток побічних реакцій хіміотерапії туберкульозу вносять супутні захворювання. Хвороби печінки, нирок і підшлункової залози вимагають обережності при внутрішньовенному введенні препаратів. Особливу групу хворих становлять люди, які страждають на алкоголізм, тому що різні побічні реакції зустрічаються у більшості цих хворих. Важливим напрямком в зниженні побічних реакцій при проведенні протитуберкульозної терапії є призначення специфічних антидотних препаратів - вітаміну В6, а також антиоксидантів (тіотриазолін, мексидол), антигіпоксантів (беметіл, оліфен, солі янтарної кислоти, комплекси з янтарною кислотою - цитофлавин), ноотропів (пірацетам,

Ноофен), метаболіотропних кардіопротекторів (мілдронат, тіотриазолін), гепатопротекторів (гептрал, тіотриазолін, есенціале). З огляду на взаємозв'язок і взаємозалежність процесів гіпоксії, оксидативного стресу та токсичних уражень, показано одночасне застосування таких препаратів, як цитофлавин і вітаміну Е; оліфену, вітаміна Е і преднізолону, тіотриазоліну і пірацетаму. Більшість пацієнтів - чоловіків, що приймають протитуберкульозні препарати, є репродуктивного віку. Якість сперми у цих пацієнтів і їх фертильність знижена. Однак, до теперішнього часу не розкритий такий напрямок при протитуберкульозній терапії, як зниження репродуктивної токсичності. Відомо, що протитуберкульозні препарати мають ембріотоксичну і тератогенну дію. Протитуберкульозні ЛЗ негативно впливають на сперматогенез, морфо-функціональні характеристики сім'яників. В останнє десятиліття, у зв'язку з виявленою роллю тіол-дисульфідної системи в прояві токсичних ефектів засобів протитуберкульозної терапії, цікавість фармакологів і клініцистів привертає метіонін та його активний метаболіт адеметіонін (гептрал). Таким чином, актуальність даної роботи на сучасному етапі безсумнівна и обумовлена, в першу чергу, відсутністю чітких даних про чоловічу репродуктивну токсичність протитуберкульозних засобів і схем медикаментозної її корекції.

Дисертацію виконано відповідно до планів науково-дослідних робіт ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» в межах тем «Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулостатиків у печінці та гонадах самців щурів» (номер державної реєстрації 0107U000393) та «Механізми гепато- та гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі (експериментальне дослідження)» (номер державної реєстрації 0110U001219), відповідальним виконавцем яких був дисертант.

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

Оцінку токсичної дії протитуберкульозних препаратів та ефективності препарату на основі метіоніну було проведено в декілька етапів. На першому етапі було визначено вплив ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу за умов їх нарізного та сумісного введення на фертильність щурів-самців, стан їх гонад та ембріо-фетальний розвиток потомства та виявлено молекулярно-біохімічні механізми, залучені до розвитку дисфункції сім'яників, за умов нарізного і сумісного введення цих препаратів щурам. Далі проведена порівняльна оцінка особливостей впливу на репродуктивну функцію щурів-самців двох загальноприйнятих комбінацій протитуберкульозних засобів, що містять ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол або стрептоміцин. На другому етапі встановлено ступінь морфо-функціональних та метаболічних змін у сім'яниках щурів, а також показників антенатального та постнатального розвитку їх потомства за умов сумісного введення ізоніазиду, рифампіцину, піразинаміду та етамбутолу на тлі експериментального алкоголізму. На третьому етапі було вивчено особливості впливу на репродуктивну здатність щурів-самців комбінації ПТЗ (протитуберкульозних засобів) за умов введення на тлі експериментального діабету I типу. П'ятим етапом було визначено гонадопротекторну ефективність метаболічних препаратів (метіоніну та Метовітану) за сумісного введення ПТЗ щурам-самцям. В результаті проведених досліджень розроблені шляхи реалізації побічної дії протитуберкульозних засобів I ряду на чоловічу репродуктивну функцію та надано обґрунтування підходів до її фармакологічної корекції. Наведені методики є загальноприйнятими в рамках поставлених завдань, в достатній мірі відображають високий рівень досліджень. Проаналізовано і зреферовано велику кількість наукової літератури та медичних джерел - 646 найменувань, з них 60 - кирилицею, 586 - латиницею. Робота ілюстрована 55 таблицями і 68 рисунками.

У роботі використано достатню кількість для достовірного аналізу лабораторних тварин (762 білих безпородних щурів обох статей, масою 150-170 г). Переконливі результати з адекватним використанням методів

статистичної обробки (кореляційний, дисперсійний, регресійний аналізи, бінарна логістична регресія) та комп'ютерне моделювання 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 Шаяхметової Г.М. являє собою дослідження, в якому вперше на основі комплексних експериментальних досліджень сформовані системні уявлення стосовно особливостей реалізації побічної дії ПТЗ I ряду на чоловічу репродуктивну функцію. Виявлено, що ПТЗ I ряду - етамбутол, піразинамід, ізоніазид та рифампіцин - за умов сумісного повторного введення щурам-самцям викликають морфо-функціональні порушення у сім'яниках, які призводять до фатального зниження фертильності та зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності потомства. Сумісне введення ПТЗ, порівняно з нарізним, викликає більш важкі морфологічні порушення у сперматогенному епітелії. За сумісного введення ПТЗ у сім'яниках білих щурів встановлено значне підвищення експресії мРНК та протеїну CYP2E1 з одночасним зростанням його ензиматичної активності, що свідчить про індукцію даної ізоформи. Це супроводжується порушенням балансу прооксиданти/антиоксиданти в тканинах сім'яників, активацією процесів апоптозу у їхніх клітинах та зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові. Отримано дані стосовно високої негативної кореляції між рівнем експресії гену CYP2E1 в гонадах щурів та кількістю сперматозоїдів за введення ПТЗ, що свідчить на користь залучення даного ізоензиму до розвитку морфо-функціональних змін у сперматогенному епітелії. Вперше показана здатність етамбутолу та ізоніазиду індукувати CYP2E1 в сім'яниках та встановлено, що серед ПТЗ,

які застосовуються сумісно, визначальна роль у порушеннях репродуктивної функції щурів-самців та зростанні рівня індукції CYP2E1 належить цим двом препаратам. Показано, що заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації ПТЗ сприяє покращенню показників репродуктивної здатності піддослідних щурів-самців та ембріо-фетального розвитку їх потомства. Встановлено, що введення комбінації ПТЗ щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до значної транскрипційної активації CYP2E1 в сім'яниках щурів. Отримано свідчення поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів за цих умов. Виявлено, що введення ПТЗ щурам-самцям на тлі алкоголізму призводить до 100 % післяімплантаційної загибелі потомства. Показано, що порушення обмінних процесів та негативний вплив на клітинну регуляцію сперматогенезу за умов тривалого (протягом 150 днів) уживання алкоголю, в тому числі, опосередковується індукцією CYP2E1 у тестикулярних тканинах, що підтверджено корелятивними зв'язками між рівнем експресії тестикулярної мРНК CYP2E1 та ушкодженням сперматогенного епітелію. За умов експериментального діабету виявлено сильні кореляційні зв'язки між рівнем експресії мРНК CYP2E1 і якісними та кількісними змінами сперматогенного епітелію. Отримано свідчення стосовно посилення несприятливого впливу ПТЗ на сім'яники, репродуктивну здатність самців та потомство за їхнього введення на тлі діабету.

Важливість для науки і практики отриманих автором результатів

Практична значущість роботи визначається тим, що вперше, виходячи з результатів аналізу, узагальнення та систематизації нових фактичних даних обґрунтовано підходи до прогнозування та попередження негативного впливу ПТЗ на чоловічі гонади. Зокрема, визначено гонадопротекторну ефективність препаратів, що володіють антиоксидантною дією та одночасно здатні інгібувати експресію CYP2E1 (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 212-2018). Встановлення ролі CYP2E1 у розвитку побічної дії ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію поглиблює

уявлення про механізми реалізації гонадотоксичної дії ксенобіотиків та слугує підґрунтям для розробки методів діагностики та попередження негативного впливу на чоловічі гонади речовин, здатних індукувати CYP2E1.

За умов проведення комбінованої терапії туберкульозу з використанням етамбутолу, рифампіцину, ізоніазиду та піразинаміду запропоновано здійснювати періодичний аналіз еякуляту з метою прогнозування та своєчасного забезпечення профілактично-лікувальних заходів щодо порушень репродуктивної функції чоловіків (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 286-2010). З метою запобігання ризиків порушення чоловічої фертильності та негативного впливу на потомство рифампіцину, ізоніазиду, піразинаміду та етамбутолу за сумісного застосування у чоловіків репродуктивного віку запропоновано прийняти до уваги можливість заміни етамбутолу на стрептоміцин, якщо це не знижуватиме ефективність терапії основного захворювання (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 295-2011). З використанням щурів розроблено та валідовано модель для комплексної оцінки опосередкованих алкоголізмом метаболічних порушень. Результати дослідження впроваджено у курс лекцій з фармакології вищих навчальних закладів медичного профілю та дослідницький процес профільних науково-дослідних інститутів, а саме Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, Буковинського державного медичного університету, ДЗ «Луганський медичний університет МОЗ України», Національного фармацевтичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Харківського національного медичного університету, відділу біохімії коферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка, Запорізького державного медичного університету.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за матеріалами дисертації опубліковано 57 наукові роботи, з них: 1 розділ в колективній монографії видавництва Elsever, 30 статей у фахових наукових виданнях (з них 3 оглядові), в тому числі 16 статей у зарубіжних виданнях, 23 тез доповідей у матеріалах конгресів, з'їздів, науково-практичних конференцій та симпозіумів, видано 3 інформаційні листи. 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 закладах.

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 - заключення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури, яка включає 646 найменування, з них 60 - кирилицею, 586 - латиницею. Дисертація ілюстрована 55 таблицями та 68 рисунками. Огляд літератури докладний і структурований, автором чітко охарактеризовані невивчені на сьогоднішній день або сумнівні аспекти, що стосуються побічних реакцій протитуберкульозних засобів. Автор продемонстрував, що застосування поліхіміотерапії туберкульозу значно збільшило число появи побічних реакцій. За сумісного прийому декількох хіміотерапевтичних

засобів спостерігається метаболічна взаємодія, внаслідок індукції або інгібування різних ізоформ цитохрому Р-450, серед яких особливе місце посідає цитохром Р-450 2Е1 (СYP2Е1) внаслідок його високої індукцибельності. Токсичність лікарських засобів, здатних індукувати СYP2Е1, зростає за умов їх одночасного прийому та/або застосування на тлі станів, які характеризуються індукцією даної ізоформи. Незважаючи на те, що 80% чоловіків, хворих на туберкульоз легень, є особами репродуктивного віку, несприятливому впливу протитуберкульозних засобів на репродуктивний потенціал чоловіків часто не приділяють уваги та недостатньо вивчають. В науковій літературі існують лише фрагментарні експериментальні та нечисленні суперечливі клінічні дані. Вищевказане визначило наукову та практичну значимість поглибленого дослідження шляхів реалізації побічної дії ПТЗ І ряду на чоловічу репродуктивну функцію, як при самотійному так і поєднаному використанні, в тому числі на тлі патологічних станів, що характеризуються індукцією СYP2Е1. Результати роботи слугують підґрунтям для визначення підходів до прогнозування негативної дії ПТЗ на чоловічу репродуктивну функцію та її фармакологічної корекції. Також в огляді наведено джерела, що демонструють негативний вклад етанолу на репродуктивне здоров'я чоловіків. Показано, що етанол знижує тестостерон, погіршує якість сперми, знижує чоловічу фертильність. Також показано, що етанол значно підвищує репродуктивну токсичність протитуберкульозних засобів. Цукровий діабет також є фактором, що обтяжує репродуктивну токсичність у чоловіків, і це пов'язано з активацією поліолового циклу глюкози, накопиченням його токсичних продуктів і формуванням дисфункції ендотелію. Ендотеліальна дисфункція на тлі тривалого застосування протитуберкульозних засобів призводить до ішемічних пошкоджень сім'яників, зниженню рухливості сперматозоїдів і т.д.

В огляді літератури Автор приводить данні щодо терапевтичної оцінки відомих лікарських засобів, що використовуються у комплексній корекції

зниження побічних ефектів протитуберкульозних засобів. В обзорі наведені характеристики таких препаратів, як модулятори цитохрома Р 450 - слабкий інгібітор Р-450 2Е1 антиоксидант катарген. Теоретично обґрунтовується перспективність модуляторів CYP2E1- полієнілфосфатидилхоліну та хлорметіазолону, індуктор деградації CYP2E1- Бортесоміб (VELCADE, раніше PS-341, LDP-341 і MLN341). Згідно даних літератури ряд речовин природного походження здатні знижувати активність CYP2E1 та можуть бути перспективними для розробки на їхній основі лікарських засобів – катехін, екстракт кульбаби, джінсен, екстрагований з женьшеню, екстракт спаржі гороцвітної, водний екстракт шавлії червонокореневищної, гліцеретинова кислота, отримана з солодки. Флавоноїди складають велику групу рослинних пігментів, присутніх в овочах, фруктах, ягодах і травах, які більшість людей споживають щодня. Показано, що флавоноїди можуть взаємодіяти з ферментами CYP450 шляхом модуляції (інгібування або індукції) біосинтезу ферментів або каталітичної активності. В обзорі Автор теоретично обґрунтовує застосування для зниження репродуктивної токсичності модуляторів тіол-дисульфідної системи – метіонін і його активний метаболіт - S-аденозил-L-метіонін. У розділі «матеріали і методи дослідження» автором приведений дизайн дослідження, вказані вид лабораторних тварин (білі безпородні щурі), джерело їх отримання, умови утримання. В дослідженнях використовувалися реактиви та органічні розчинники категорії х.ч. або ч.д.а. виробництва «Хімлаборреактив», Україна та фірми «Sigma-Aldrich». Охарактеризовані експериментальні моделі цукрового діабету та хронічного алкоголізму. У роботі використовувалась найбільш адекватна клінічним проявам цукрового діабету модель, яка полягає у введенні тваринам стрептозотоцину. Ця модель цукрового діабету дозволяє відтворити реалізацію клітинно-молекулярно-патобіохімічного каскаду індукції CYP2E1 у печінці та гонад самців-щурів. Хронічний алкоголізм моделювали шляхом добровільного споживання 15% розчину етанолу протягом 150 днів. Дисертантом, враховуючи, що завданнями даної

роботи було визначення особливостей побічної дії протитуберкульозних ЛЗ на чоловічу репродуктивну функцію за умов нарізного та сумісного застосування, в тому числі на фоні експериментального алкоголізму та діабету I типу, дослідження було проведене у декілька етапів.

На першому етапі вивчали вплив ізоніазиду, рифампіцину, піразинамиду і етамбутолу за умов їх сумісного та нарізного введення на стан репродуктивної функції щурів-самців. На другому етапі проводили порівняльну оцінку репродуктивної токсичності протитуберкульозних ЛЗ при їх комбінуванні. На третьому етапі оцінювали репродуктивну токсичність щурів-самців після введення протитуберкульозних ЛЗ на тлі хронічного алкоголізму. На четвертому етапі оцінювали вплив на печінку комбінованого введення протитуберкульозних ЛЗ на тлі цукрового діабету I типу. На п'ятому етапі проведено оцінку захисної дії метіоніну і його комбінованого препарату – метовітану на репродуктивну функцію. В роботі використовували сучасні фармакологічні, біохімічні, імуногістохімічні, морфометричні та статистичні методики. Також в роботі використовували комп'ютерне моделювання взаємодії протитуберкульозних ЛЗ з СYP2E1.

В третій главі Автором встановлено, що введення щурам-самцям етамбутолу, ізоніазиду та комбінації протитуберкульозних засобів (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід) в терапевтичних дозах протягом усього періоду сперматогенезу супроводжується зниженням вмісту загального тестостерону у сироватці крові в 1,6-2,8 рази ($p \leq 0,05$).

Сумісне застосування протитуберкульозні засобів порівняно з нарізним їх введенням викликає більш виражене порушення нормоспермії у щурів-самців (зниження продукції сперматозоїдів - втричі, зменшення їх життєздатності - на 74 % ($p \leq 0,05$), зниження часу рухливості – на 80 % ($p \leq 0,05$), що веде до згубного зниження фертильності щурів-самців (індекс запліднювальної здатності знижується до 17%). Сумісне застосування протитуберкульозних засобів порівняно з нарізним їх введенням викликає більш важкі морфологічні порушення у сперматогенному епітелії, які

виявляються за зниженням сперматогенного індексу та числа сперматогоній, підвищенням відсотку випадків злушення сперматогенного епітелію в просвіт каналця, спустошенням і деформацією сім'яних каналців, появою багатоядерних синтиціїв в зоні сперматоцитів I порядку. Результати морфологічних досліджень свідчать, що дистрофічні та деструктивні зміни у статевих залозах щурів-самців за сумісного введення протитуберкульозних засобів, очевидно, найбільшою мірою обумовлені етамбутолом та ізоніазидом.

За умов сумісного введення протитуберкульозних засобів щурам-самцям спостерігається зменшення плодючості запліднених ними самиць на 81 % ($p \leq 0,05$) та значне зростання рівня до- і післяімплантаційної смертності ембріонів на 55 % ($p \leq 0,05$) та 73 % ($p \leq 0,05$) відповідно. Ключова роль в реалізації негативних ефектів на потомство належить етамбутолу.

В четвертій главі Дисертант показав, що протитуберкульозні засоби I ряду за умов сумісного введення щурам індукують CYP2E1 в сім'яниках, про що свідчить значне зростання експресії його мРНК та протеїну, а також підвищення ензиматичної активності в тестикулярних клітинах. Серед протитуберкульозних засобів I ряду при нарізному застосуванні найвищу здатність індукувати CYP2E1 та тестикулярну токсичність виявляють ізоніазид та етамбутол. Зростання експресії мРНК та білка CYP2E1 з наступним підвищенням його ензиматичної активності за умов введення етамбутолу, ізоніазиду та комбінації 4-х ПТЗ в числі інших механізмів можуть бути залучені до механізмів розвитку порушень сперматогенезу. На користь цього свідчать дані стосовно високої негативної кореляції між рівнем експресії гену CYP2E1 у гонадах щурів та кількістю сперматозоїдів. Індукція тестикулярного CYP2E1 за нарізного введення етамбутолу й ізоніазиду, а також сумісного введення всіх чотирьох протитуберкульозні засобів супроводжується порушеннями про- та антиоксидантного статусу в сім'яниках (зниження активності СОД та вмісту відновленого глутатіону, зростання активності глутатіонтрансферази, активація ПОЛ). Нарізне та

сумісне введення етамбутолу, ізоніазиду, рифампіцину та піразинамиду призводить до зростання фрагментації ДНК у клітинах сім'яників та епідидимісів, що свідчить про активацію процесів апоптозу.

В п'ятій главі наведені результати власних досліджень, що відображають порівняльне дослідження впливу двох комбінацій ПТЗ, що містять ізоніазид, рифампіцин, піразинамід та етамбутол або стрептоміцин на рівень експресії гену CYP2E1 та фрагментації ДНК у гонадах самців щурів, а також показників, що характеризують їх репродуктивну здатність. Так, за умов заміни етамбутолу на стрептоміцин відбувається покращення показників репродуктивної здатності піддослідних щурів-самців, ембріо-фетального розвитку їх потомства. Нарізне введення стрептоміцину викликає менш виражені морфологічні порушення в сім'яниках, ніж нарізне введення етамбутолу. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації протитуберкульозних засобів сприяє зниженню покращенню стану сперматогенного епітелію. Стрептоміцин за умов нарізного введення на відміну від етамбутолу не впливає на експресію мРНК CYP2E1 в сім'яниках щурів. Заміна етамбутолу на стрептоміцин в комбінації протитуберкульозних засобів не запобігає зростанню тестикулярної експресії гену CYP2E1, ймовірно внаслідок наявності ізоніазиду. Відносний вміст фрагментів ДНК в сім'яниках та епідидимісах щурів зростає порівняно з контролем за введення протитуберкульозних засобів в обох комбінаціях, що свідчить про індукцію апоптозу незалежно від наявності стрептоміцину або етамбутолу.

Зміни біохімічних показників гонад є більш глибокими за умов введення комбінації 1. Комбінація 1, що містить етамбутол, порівняно із контрольною групою викликала зростання швидкості утворення продуктів реакції з ТБК у сім'яниках щурів (на 15 %, $p \leq 0,05$) та у суспензії сперматозоїдів з епідидимісів (на 38 %, $p \leq 0,05$), а також зниження вмісту відновленого глутатіону у сім'яниках (на 23 %, $p \leq 0,05$). Комбінація 2, що містить стрептоміцин, призводила до підвищення ліпопероксидації лише у сім'яниках.

В шостій главі показано значний негативний вплив тривалої експозиції алкоголю на гонади щурів-самців: зменшення числа сперматозоїдів та часу їх рухливості, дегенеративні зміни сперматогенного епітелію (зниження індексу сперматогенезу та кількості сперматогоній, зростання відсотку випадків злушення епітелію в просвіт канальця та «вікон»). Отримані дані засвідчують поглиблення порушень диференціації клітин сперматогенного епітелію та нормоспермії у щурів, які на тлі хронічного експериментального алкоголізму отримували протитуберкульозні засоби. Відсоток випадків злушення епітелію в просвіт канальця в групі тварин з хронічним алкоголізмом порівняно з контролем зростав у 4 рази ($p \leq 0,05$), а у групі з введенням протитуберкульозних засобів у 5 разів ($p \leq 0,05$); відсоток появи «вікон» збільшувався відповідно у 7 та 9 разів ($p \leq 0,05$); кількість сперматогоній знижувалась на 14 % та 20 % відповідно ($p \leq 0,05$). Крім того, за умов введення протитуберкульозних засобів порівняно з контролем та алкоголь-залежними тваринами знижувались абсолютна і відносна маса епідидимісів ~ 15 % ($p \leq 0,05$) та кількість сперматозоїдів відповідно у 2,4 та 1,6 разів ($p \leq 0,05$).

Порушення процесів сперматогенезу та зниження кількості та якості сперматозоїдів за умов введення протитуберкульозних засобів призводили до очевидного зниження плодючості щурів-самців. Індекс їх запліднювальної здатності знижувався порівняно з контролем та тваринами з хронічним алкоголізмом відповідно у 3,2 та 2,4 разів ($p \leq 0,05$). Тривале споживання самцями щурів 15 % етанолу мало віддалені негативні наслідки щодо антенатального та постнатального розвитку їх потомства. Порівняно з контрольною групою показано 22 % збільшення рівня доїмплантаційної та загальної смертності ($p \leq 0,05$); зростання смертності новонароджених у різні терміни постнатального розвитку; істотну зміну локомоторної та емоційної реактивності в тесті «відкрите поле» на 21-й день постнатального розвитку, а саме зниження горизонтальної (-32-44 %; $p \leq 0,05$), вертикальної (-26 %;

$p \leq 0,05$) та дослідницької (-46 %; $p \leq 0,05$) активності. За умов парування інтактних самиць із самцями, яким на тлі алкоголізму вводили протитуберкульозні засоби, відсоток доімплантаційної ембріональної загибелі перевищував контрольний рівень більше, ніж втричі та дорівнював такому у групі із споживанням самого алкоголю, але постімплантаційна смерть сягнула 100 %. Тривале вживання протягом 150 днів 15 % розчину етанолу щурами викликає у печінці та сім'яниках значне зростання експресії мРНК (у 4,9 та 3 рази, $p \leq 0,05$) і протеїну CYP2E1 (в 2,4 та в 1,4 рази, $p \leq 0,05$). Введення комбінації протитуберкульозних засобів щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до прогресуючого збільшення експресії CYP2E1 в печінці та сім'яниках щурів у 5 та 5,9 разів ($p \leq 0,05$). В той самий час не виявлено подальшого росту експресії печінкового та тестикулярного протеїну CYP2E1, її рівень у цих щурів був майже таким же, як у тварин, які споживали лише алкоголь.

Введення комбінації протитуберкульозних засобів щурам-самцям з експериментальним хронічним алкоголізмом призводить до зростання активності *p*-нітрофенолгідроксилази (маркера CYP2E1) у мікросомній фракції клітин печінки в 1,5 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з групою «хронічний алкоголізм». Рівень експресії гену CYP2E1 в сім'яниках виявив високу негативну кореляцію з величиною сперматогенного індексу ($r = -0,99$; $p = 0,001$) і високу позитивну кореляцію з відсотком випадків злушення епітелію в просвіт каналця ($r = 0,99$; $p = 0,001$). Отримані результати дозволяють припустити можливість залучення даного ізоферменту до неспецифічних патогенетичних механізмів чоловічої субфертильності та інфертильності.

У печінці та сім'яниках щурів з експериментальним хронічним алкоголізмом суттєво інтенсифікуються процеси фрагментації ДНК порівняно з контролем. Як у печінці, так і у сім'яниках основну частину високомолекулярних фрагментів ДНК складають фракції ланцюжків довжиною 1000 п.о. За введення щурам протитуберкульозних засобів на цьому тлі не виявлено суттєвої інтенсифікації фрагментації ДНК, але

показано зміну характеру ураження структури ДНК та її деградації до рівня олігонуклеотидів. Високий рівень фрагментації ДНК в сім'яниках свідчить про запуск процесів апоптозу. Хронічна експозиція етилового спирту та одночасне введення протитуберкульозних засобів викликають складні метаболічні зміни на різних рівнях організму щурів-самців: розвиток оксидативного стресу у печінці та сім'яниках; зміни в амінокислотному складі сироватки крові, колагену I типу та сім'яників; зростання в сім'яниках вмісту загального (+25 %; $p \leq 0,05$) та етерифікованого холестерину (+45 %; $p \leq 0,05$), зниження вмісту SH-груп (-36 %; $p \leq 0,05$); модуляцію вмісту відновленого глутатіону, пригнічення ензиматичної активності тестикулярної СДГ за одночасного зростання ЛДГ. Виявлені порушення метаболізму у сім'яниках можуть мати негативні наслідки для клітинної регуляції процесів сперматогенезу.

В сьомій главі Автор показав, що має місце посилення порушень морфофункціонального стану сім'яників та репродуктивної здатності щурів-самців із діабетом за умов сумісного введення протитуберкульозних засобів (етамбутол, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід). Діабетичний стан та особливо введення на цьому тлі ПТЗ негативно позначалось на ембріо-фетальному та постнатальному розвитку потомства щурів-самців, що проявлялось зростанням рівня післяімплантаційної смертності (у 6 і 13 разів відповідно; $p \leq 0,05$), загальної смертності (у 2 і 4 рази відповідно; $p \leq 0,05$), а також впливом на ЦНС - підвищенням рівня тривожності за показниками активності в тесті «відкрите поле» порівняно з контролем.

Сумісне введення протитуберкульозних засобів на тлі СТЗД призводило до подальшої стимуляції тестикулярної експресії гену CYP2E1, зростання його ензиматичної активності та змін рівня і характеру фрагментації нуклеарної ДНК у сім'яниках щурів.

У щурів з діабетом виявлено сильні кореляційні зв'язки між рівнем експресії мРНК CYP2E1 і кількістю сперматогоній ($r = -0,99$; $p = 0,001$) і появою «вікон» ($r = 0,96$; $p = 0,001$), а також кореляцію середнього ступеню

між інтенсивністю тестикулярної експресії гену CYP2E1 та кількістю випадків злуцнення сперматогенного епітелію в просвіт каналців ($r = 0,65$; $p = 0,01$). Ймовірно, CYP2E1 є важливою початковою ланкою у генерації АФК та інших токсичних метаболітів в сім'яниках, які згодом пошкоджують ДНК та негативно впливають на чоловічу репродуктивну функцію.

Виявлені нами за умов сахарного діабету першого типу зміни в амінокислотному складі колагену I типу та порушення полового статусу організму можуть впливати на властивості та правильне функціонування сперматогенного епітелію та інших тканин репродуктивних органів.

У восьмій главі Дисертант продемонстрував, що Метовітан більш ефективно, ніж метіонін, сприяв збереженню цілісності сперматогенного епітелію щурів, яким вводили ПТЗ. Покращуючи стан сперматогенного епітелію, метіонін та Метовітан сприяли підвищенню кількості сперматозоїдів у хвостовій частині епідидимісів та фертильності щурів.

За умов сумісного введення щурам ПТЗ протягом періоду сперматогенезу метіонін та оригінальна композиція Метовітан показали здатність пригнічувати транскрипційну активацію гену CYP2E1, а також інгібувати його ензиматичну активність в сім'яниках. При цьому, Метовітан виявився більш ефективним у порівнянні з метіоніном. Встановлено позитивний ефект Метовітану щодо рівня фрагментації ядерної ДНК у сім'яниках щурів, які отримували ПТЗ. За його введення відсоток фрагментації ДНК наближався до контрольних значень. Уведення метіоніну не справляло вираженого впливу на даний показник.

Введення метіоніну та Метовітану на фоні застосування ПТЗ ефективно попереджало зміни параметрів про/антиоксидантної системи сім'яників щурів.

В дев'ятій главі Дисертант проаналізував і обговорив отримані експериментальні дані і зробив висновок, що отримані результати стосовно гонадопротекторної дії метіоніну та Метовітану при введенні на тлі протитуберкульозних засобів, що індукують CYP2E1, експериментально

обґрунтовують перспективність використання речовин, які володіють ефективними інгібіторними стосовно даної ізоформи та антиоксидантними властивостями у схемах лікування та профілактики чоловічої субфертильності та інфертильності, особливо за умов застосування хіміотерапевтичних засобів, здатних індукувати CYP2E1 та станів, що супроводжуються індукцією цього ізоензиму.

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 їх 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 літературному огляді немає теоретичного обґрунтування використання модуляторів тіол-дисульфідної системи як засобів зниження репродуктивної токсичності протитуберкульозних ЛЗ.

2. Автор в огляді мало приділив уваги аналізу фармакологічних властивостей метіоніну, його активного метаболіту і комбінованих препаратів на його основі.

3. Не проведено розрахунок виживаності новонароджених за методом Каплана-Мейєра з розрахунком кумулятивного критерію виживання всередині групи.

4. Як маркер оксидативного стресу у сім'яниках визначався рівень МДА за методом І.Д.Стальної. Однак, цей метод потребує достатньо великої

навіски тканини і використання трихлороцтової кислоти, що часто призводить до викривлення результатів, особливо при роботі з маловагими органами. Крім цього, багатьма сучасними рекомендаціями МДА не розглядається як специфічний маркер оксидативного стресу. З цією метою визначають нітротирозин, карбонізовані білки, 8-гідрогуанин и т.д. методом ІФА або імуноблотингом.

5. Відновлений глутатіон визначали за допомогою реактиву Елмана, який є неспецифічним реактивом і реагує з тіольними групами всіх білкові інтермедіатів тіол-дисульфідної системи.

6. Немає експериментального обґрунтування доз метіоніну і метовітану.

7. На сьогодні для регуляції чоловічої фертильності і корекції її порушень використовують такі препарати, як а-токоферол, препарати відновленого глутатіону, препарати селену, мелатоніну тощо. Однак, Дисертант не вибрав жодного з них у якості препарату порівняння. Не був запрошеним і препарат Гептрал - S-аденозил-метіонін - активний метаболіт метіоніну.

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. Поясніть роль поліморфних варіантів генів системи метаболізму ксенобіотиків у розвитку резистентних форм туберкульозу. Які Ви бачите шляхи зменшення репродуктивної токсичності при лікуванні резистентних форм туберкульозу у пацієнтів з поліморфізмом CYP2C19, CYP2E1, GSTT1, GSTM1 и GSTP1?
2. Вами відзначено формування ознак гонадотоксичності на тлі значної активації оксидативного стресу. Поясніть механізми ініціації цього процесу при застосуванні протитуберкульозних препаратів. Вкажіть,

які ланки - мішені цього патологічного процесу найбільш перспективні для зменшення репродуктивної токсичності.

3. У своєму дослідженні Ви обґрунтовуєте використання метіоніну і його лікарської комбінації метовітану як засобу, що зменшує негативний вплив протитуберкульозних засобів на репродуктивну токсичність. Чи можна розглядати механізм захисної дії метіоніну і метовітану через призму глутатіон-опосередкованої регуляції експресії генів і формування ендогенної цитопротекції?

Висновки

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 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. 10 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, а дисертант заслуговує присвоєння шуканого ступеня за спеціальністю - 14.03.05 – фармакологія.

Завідувач кафедри фармакології та
медичної рецептури Запорізького державного
медичного університету
професор



І.Ф. Беленічев