

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Шастун Наталії Петрівни «Аналіз механізмів співвідношення протисудомної активності та побічної дії антиконвульсантів різних груп», подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія

Актуальність теми дисертації

Епілепсія є одним з найпоширеніших захворювань нервової системи, що вимагає проведення тривалої, а іноді і довічної протисудомної терапії. Одним з головних напрямків в епілептології є вивчення впливу антиконвульсантів на якість життя пацієнтів яка, в свою чергу, є критерієм ефективності терапії. Адже такі побічні ефекти, як зниження пам'яті, концентрації уваги, запаморочення, порушення когнітивних функцій притаманні майже всім антиконвульсантам. В останні роки приділяється велика увага вивченню механізмів виникнення і розвитку епілепсії, а також розробці найбільш раціональних і ефективних шляхів профілактики та лікування цього патологічного стану. Біохімічні аспекти епілепсії широко дискутуються в сучасній літературі. Обговорення включає вивчення характеру, ролі молекулярно-біохімічного діалогу при епілепсії, виявлення додаткових можливих молекулярно-біохімічних маркерів для оцінки ефективності протисудомної терапії, прогнозування перебігу захворювання. Епілептичні припадки, що повторюються, супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин в головному мозку і значними дісгемічними порушеннями. Вони запускають каскад біохімічних реакцій, які лежать в основі тканинного ушкодження. Локальна тканинна гіпоксія при судомках призводить до надмірного викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій з накопиченням надлишкової кількості вільних радикалів кисню, розвитку оксидантного стресу, посиленню ексайтотоксичних ефектів, надмірного збудження і пошкодження глутаматних рецепторів. Рядом робіт показано, що при моделюванні коразолових нападів в сенсомоторній корі

головного мозку збільшується експресія індукцибельної і, особливо, нейрональної NO-синтази на тлі дефіциту тіольнихсполук - сумарних відновлених тіолів, відновленого глутатіону і зниження активності глутатіонредуктази. Однак, до теперішнього часу не визначено співвідношення фармакологічних ефектів та побічних дій антиконвульсантів, що може бути теоретичною основою оптимізації фармакотерапії судомних станів та підвищення якості життя хворих з епілепсією. Таким чином, актуальність даної роботи на сучасному етапі безсумнівна і обумовлена, в першу чергу, відсутністю чітких заходів з підвищення безпечності лікування епілепсії.

Дисертаційна робота виконана як фрагмент планової науково-дослідної роботи кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей болезаспокійливої та нейропротекторної медикаментозної терапії в умовах модельованої патології» (№ держреєстрації 0104U006269). Автор є відповідальним виконавцем даної теми.

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

Виконання даного дисертаційного дослідження проводилося в кілька етапів. Проводився порівняльний аналіз активності антиконвульсантів на різних моделях хемоіндукованих пароксизмів, досліджувались порушення психічної працездатності тварин, що викликані цими препаратами (пам'ять, емоційно-рухова сфера). Потім вивчався вплив дослідних препаратів на фізичну працездатність (координація рухів, міорелаксація, тривалість плавання з вантажем) та визначення гіпногенної дії препаратів досліджуваних груп (потенціювання і пролонгування дії снодійних). На останньому етапі дослідження оцінювався вплив антиконвульсантів з різним механізмом дії на патобіохімічні порушення в головному мозку в умовах еквівалентів епілепсії. 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 (244 джерел, з них іноземних – 189).

У роботі використано достатню кількість для достовірного аналізу лабораторних тварин (864 білих нелінійних щурів та 120 білих нелінійних мишей). 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 Шастун Н.П. являє собою дослідження, в якому вперше встановлено, що коразолів кіндлінг супроводжується зміщенням тіол-дисульфідної системи нейрону за рахунок зниження її відновлених інтермедіатів - значного зниження рівня цитозольного глутатіону і пригнічення активності глутатіонредуктази. Вперше показано, що антиконвульсанти, дія яких супроводжується підвищенням вмісту відновленого глутатіону та зниженням рівня маркера нітрозуючого стресу в головному мозку, проявляють менш виражені побічні ефекти по відношенню до когнітивних функцій ЦНС. Встановлена залежність між індексом нітротирозин/глутатіон відновлений при коразоловому кіндлінгу та впливом антиконвульсантів на когнітивні процеси - чим вищий індекс, тим більш негативний вплив чинять антиконвульсанти на когнітивні функції. Встановлено, що антиконвульсанти з переважною ГАМК-ергічною дією мають більш виражену антипароксизмальну активність, однак більш негативно впливають на когнітивні процеси (пам'ять, здатність до навчання, увагу). Антиконвульсанти з переважно глутаматергічною дією мають менш виражену антипароксизмальну активність, однак менший негативний вплив

на когнітивні процеси. Збереженість когнітивних функцій при реалізації терапевтичного ефекту глутаматергічних антиконвульсантів пояснюється виявленням в їх механізмі дії нейропротективним ефектом (підвищенням виживаності нейронів, підвищенням їх трансляційної активності та зниженням нейроапоптозу і підвищенням експресії bcl-2), а також позитивною модуляцією стану тіол-дисульфідної системи, зниженням щільності nNOS- і iNOS-позитивних клітин у сенсомоторній зоні кори головного мозку після судомного нападу. Наукова новизна підтверджена патентом України №74602 «N-(біцикло [2,2,1]гепт-5-ен-ендо-2-їлметил)-3-гідрокси-1,1-діоксотіалоніл-4-сульфоніламід, який виявляє анагетичну та транквілізуючу дію».

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 хворих на епілепсію. Результати роботи експериментально обґрунтовують використання в клінічній практиці коефіцієнта нітротирозин/відновлений глутатіон для прогнозу нейротоксичних побічних реакцій при призначенні антиконвульсантів та для раціонального підбору препаратів – модуляторів системи глутатіону, для корекції цих явищ і підвищення безпечності протиепілептичної терапії. Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес кафедр фармакології Національного фармацевтичного університету, Запорізького державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах

Говорячи про повноту викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих наукових працях, необхідно відзначити, що автором за темою

репродуктивного здоров'я (вальпроати). Отже, слід зауважити, що на сьогоднішній день достовірно вивчені побічні ефекти пов'язані з організмом хворого, з людським фактором, однак немає зв'язку та систематизації побічних дій, пов'язаних з механізмом дії антиконвульсантів. Залишається актуальною необхідність проведення кореляції, наскільки пов'язаний механізм дії з частотою виникнення побічних ефектів, тому що шлях до раціональної фармакотерапії лежить через дослідження взаємовідносин терапевтичної дії та небажаних побічних ефектів. Також в обзорі автором детально описані патобіохімічні механізми ушкодження нейронів. Розкрито роль ГАМК-ергічної глутаматергічної систем в цьому процесі. Детально розглянуто молекулярно-біохімічні процеси глутаматної ексайтотоксичності при епілептогенезі. Приведено, що найбільше значення при багатьох патологічних станах має окислювальна модифікація піримідинових основ і неконтрольована продукція АФК біоенергетичними і нейрохімічними системами нейрону, і подальший розвиток оксидативного стресу є важливою ланкою ушкоджуючої дії нейронів при нейродеструктивних захворюваннях, у тому числі і при епілептизації. У розділі «матеріали і методи дослідження» автором приведений дизайн дослідження, вказані вид лабораторних тварин (білі безпородні щури та миші), джерело їх отримання, умови утримання. Охарактеризовані експериментальні моделі епілепсії. У роботі використовувалися моделі, які є найбільш адекватними клінічним проявам епілепсії - модель пентілектетразолових судом, модель бікукулінових судом, судом, викликані введенням каїнової кислоти, ареколінових судом, нікотинних судом. Також використовувалась модель коразолового кідлінгу. Ця модель дозволяє відтворити не тільки реалізацію клітинно-молекулярно-патобіохімічного каскаду нейродеструкції, характерного для епілепсії в клініці, але і прояви когнітивного дефіциту у лабораторних тварин. У роботі використовували сучасні фармакологічні, електрофізіологічні, біохімічні, морфометричні і імуногістохімічні методи. Дисертантом розроблено підхід в декілька етапів до оцінки протисудомної активності побічних

реакційвідібраних препаратів (фенобарбітал, карбамазепін, ламотриджин, вальпроат, топірамат), що дозволило виявити молекулярні і біохімічні механізми, які лежать в основі як побічних реакцій, так і проти судомної і нейропротективної дії препаратів.

У третій главі дисертант експериментально встановив, що антиконвульсанти мають різну протисудомну активність. Так, вальпроат натрію, який за своїми властивостями стимулює ГАМКергічні механізми, при коразолових судамах значно зменшував клонічні судоми та середній бал судомного процесу, а також не викликав тонічних судом та летальних випадків. Однак на моделі бікукулінових судом він не проявив ніякої протисудомної активності. Він також незначно знижував летальність на тлі каїнової кислоти. Виявив найліпшу протисудомну дію та здатність попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину. Однак він не попереджував виникнення гіперсалівації та тремору при введенні ареколіну, а лише збільшував тривалість латентного періоду тремору порівняно з контролем на 10,1 %. Також встановлено, що карбамазепін, який за своїм механізмом дії посилює ГАМКергічні процеси та взаємодію з центральними аденозиновими рецепторами, не впливав на клонічні судоми при введенні коразолу, однак суттєво зменшував частоту тонічних судом та летальність. Він виявив найбільшу протисудомну активність на моделі бікукулінових судом та незначно знижував інтенсивність судомного синдрому і летальність на моделі каїнових судом. За здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину карбамазепін виявився на другому місці. На моделі ареколінових судом карбамазепін не попереджував виникнення гіперсалівації, але зменшував тривалість тремору.

Встановлено, що топірамат, механізм дії якого полягає в інгібуванні глутаматних рецепторів та в активації ГАМК рецепторів, не запобігав клонічним судамам і летальності при введенні коразолу та викликав збільшення середнього балу судом. Недостатньо потужним, але більш ефективним, він проявив себе на моделі бікукулінових судом, незначно

знизивши частоту тонічних судом, летальність та інтенсивність судом. На моделі каїнових судом, топірамат не виявив протисудомної активності. Введення топірамату на тлі нікотину викликало незначне зниження інтенсивності судом та вдвічі знижувало летальність, не впливаючи на інші показники. На тлі ареколінових судом топірамат лише зменшував тремор. Габапентин, який подібний до нейротрансмітеру ГАМК, але механізм дії якого відрізняється від інших засобів, які взаємодіють з ГАМК-рецепторами при коразолових судах, не запобігав клонічним судом і летальності, та викликав збільшення середнього балу судом. Габапентин характеризувався найбільшою протисудомною активністю при введенні бікукуліну та не мав анти- пароксизмальної активності при введенні каїнової кислоти. Габапентин на тлі нікотинових судом знижував частоту клонічних судом, однак і підвищував частоту тонічних судом. На моделі ареколінових судом застосування габапентину зменшувало латентний період тремору. Ламотриджин, як блокатор вивільнення глутамату, не запобігав клонічним судом і летальності при застосуванні коразолу. На моделі бікукулінових судом виявився ефективнішим за топірамат, при використанні якого достовірно знижувались бали судомного синдрому на 20%. Він не проявив протисудомної активності при введенні каїнової кислоти, однак знижував вдвічі частоту тонічних судом, летальність та на 14,3% бальність судомного синдрому на моделі нікотинових судом. Він найбільше серед досліджуваних антиконвульсантів здатен скорочувати тривалість тремору при ареколінових судах. В четвертій главі дисертант приводить данні експериментальних досліджень, якими показано, що найбільш негативний вплив на психічну та фізичну працездатність чинив карбамазепін. Введення вказаного препарату призводило до зниження здатності до навчання у тесті УРПУ (40 % навчених тварин), консолідація пам'ятного сліду зберігалася у 70 %, а при відтворенні енграм пам'яті кількість тварин зі збереженими навиками складала 60 %. Пригнічення фізичної працездатності на фоні використання карбамазепіну проявлялося у зменшенні латентного часу падіння у ротород-тесті на 65,28 %,

тривалості втримування на дроті – на 43,23 %, а також збільшення тривалості сну у 2,3 рази. Показано також, що карбамазепін має досить потужну депримуєчу дію на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів. Застосування топірамату позитивно впливало на збереження навички пасивного уникнення у щурів, однак знижувало кількість навчених тварин до 70 %, не вплинуло на пам'ять про негативний досвід після навчання (консолідація пам'ятного сліду), а також суттєво не впливало на відтворення енграм пам'яті. Спостереження Шастун Н.П. показали також негативний вплив топірамату на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів, який знижував горизонтальну рухову активність на 65,61 % ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. В той же час показник зниження вертикальної рухової активності був менший ніж при використанні карбамазепіну, ламотриджину та габапентину і складав 64,3 % ($p < 0,001$) у порівнянні з контролем. Слід відзначити, що введення топірамату досить суттєво зменшувало кількість вмивань, що свідчить про зниження комфортності стану тварин, підвищення страху, й відповідно, пригнічення їхнього емоційного стану. Достовірних даних щодо впливу топірамату на координацію рухів не було виявлено. Дослідження показали, що топірамат не має значної міорелаксуючої дії, але впливає на фізичну працездатність, зменшуючи тривалість плавання мишей з вантажем 1/10 маси тіла на 34,2 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Дослідження Шастун Н.П. вперше показали також, що топірамат суттєво збільшує тривалість сну та посідає друге місце після карбамазепіну. Дослідження побічних ефектів ламотриджину показало, що він має найменший негативний вплив на навчання, консолідацію пам'ятного сліду та на відтворення енграм пам'яті. Введення вказаного препарату показало і найменший вплив на горизонтальну рухову активність, але досить негативно введення ламотриджину вплинуло на вертикальну активність, нірковий рефлекс та грумінг. Спостереження показали, що достовірного впливу на координацію ламотриджин не мав. Отримані Шастун Н.П. результати дозволили встановити й найменший вплив досліджуваного антиконвульсantu на фізичну

працездатність та гіпногенну дію. Дослідження Шастун Н.П. вперше показали, що габапентин та вальпроат натрію не мають значного впливу на процеси пам'яті. При дослідженні їх впливу на орієнтовно-дослідницьку діяльність габапентин на рівні з ламотриджином проявляв найменший негативний вплив на горизонтальну рухову активність, а вальпроат натрію виявив найменший вплив на вертикальну рухову активність, що свідчить про незначну депримуєчу дію. Спостереження Шастун Н.П. показали, що габапентин володіє менш потужним, ніж карбамазепін, але дуже суттєвим нейротоксичним ефектом, показник середнього латентного часу при його застосуванні зменшувався на 49,1% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Отримані дисертантом результати дозволили також встановити, що габапентин не має вираженого гіпногенного ефекту. В п'ятій главі Шастун Н.П. приводить результати експериментальних досліджень, якими показано, що найбільш виражену нейропротективну активність серед досліджуваних протисудомних препаратів на моделі корозолового кіндлінгу чинив ламотриджин. Встановлено, що курсове призначення ламотриджину попереджувало падіння рівня відновленої форми глутатіону на 48,1%, загальної кількості SH-груп на 26,6% та сприяло ре активуванню глутатіонредуктази на 64,6% у порівнянні з контролем. Шастун Н.П. встановлено, що введення ламотриджину призводило до статистично значимого зниження експресії nNOS на 44,0%, кількість iNOS-позитивних клітин зменшувалася на 35,6%, а щільність апоптично змінених клітин – на 31,5% на фоні підвищення числа bcl-2- позитивних клітин на 23,9%.

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 впливають 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. Немає розрахунку дози ED_{50} із залученням методу кривих «непаралельні дози-реакція» для препаратів, що досліджувались, при вивченні їх побічних ефектів і нейропротективної та противосудомної дії.
2. Для більш повної оцінки транскрипційних процесів в нейронах, крім концентрації РНК, також необхідно було б визначити експресію генів раннього реагування c-fos.
3. Бажано провести кореляційний аналіз між індексом нітритрозин/відновлений глутатіоні УРПУ.

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. Вами вперше встановлено, що антиконвульсанти, що вивчалися, надають нормалізуючу дію на тіол-дисульфідну систему головного мозку, а саме, на її глутатіонову ланку. Чи можна розглядати механізм нейропротективної дії цих препаратів через призму нейрохімічних і нейрофізіологічних глутатіон - опосередкованих реакцій ендогенної нейропротекції і нейропластичності?

2. Відомо, що важливим механізмом нейродеструкції при епілепсії, а також у формуванні побічних реакцій деяких антиконвульсантів є гіперпродукція АФК нейрохімічними системами нейрону. Чи можлива антиоксидантна модуляція нейропротективної дії і побічних реакцій сучасних антиконвульсантів? Які класи антиоксидантів підходять для цього?

3.Вами вперше показана роль нітрозуючого стресу у формуванні побічних ефектів антиконвульсантів. Поясніть, які ланки цього патохімічного процесу можуть бути фармакологічними мішенями для зниження побічних ефектів антиконвульсантів?

Висновки

Дисертація Шастун Наталії Петрівни «Аналіз механізмів співвідношення протисудомної активності та побічної дії антиконвульсантів різних груп» 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 і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, а дисертант заслуговує присвоєння наукового ступеня за спеціальністю - 14.03.05 – фармакологія.

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

