

## ВІДЗИВ

офіційного опонента професора Горчакової Надії Олександрівни  
на дисертаційну роботу Шастун Наталії Петрівни  
«Аналіз механізмів співвідношення протисудомної активності та  
побічної дії антиконвульсантів різних груп»,  
представлену до Спеціалізованої Вченої Ради Д.26.550.01  
при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»  
на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук  
за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

**Актуальність обраної теми дисертації.** Одним з найпоширеніших захворювань центральної нервової системи в світі вважають епілепсію. Незважаючи на існування протиепілептичних лікарських засобів з диференційованим механізмом синаптичної дії, не визначені остаточні патобіохімічні показники порушень в головному мозку, що супроводжуються змінами психічної і фізичної працездатності, які можуть бути мішенню впливу нейротропних препаратів. В зв'язку з вищезазначеним, дисертаційна робота Шастун Н.П. «Аналіз механізмів співвідношення протисудомної активності та побічної дії антиконвульсантів різних груп» є актуальною, своєчасною, тому що експериментально теоретично визначає взаємозв'язок між ефективністю та безпечністю антиконвульсантів різної хімічної будови та різних механізмів протисудомної дії.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформованих в дисертації, достовірність, новизна.** Дисертаційна робота виконана як фрагмент планової науково-дослідної роботи кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія» «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей болезаспокійливої та нейропротекторної медикаментозної терапії в умовах моделюємої патології» (№ держреєстрації 0104U006269). Дисертаційна робота виконана та оформлена за вимогами, викладена на 147 сторінках комп'ютерного тексту, складається зі



вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел, що включає 244 роботи, з них латиницею 183. Роботу проілюстровано 19 таблицями, 22 рисунками. Огляд літератури «Протиепілептична терапія та особливості впливу антиконвульсантів на організм» складається з 3 підрозділів: «Питання безпеки застосування антиконвульсантів», «Патобіохімічні порушення в головному мозку при епілепсії», «Роль оксидативного стресу в процесі нейродеструкції при епілепсії». В роботі застосовані фармакологічні, біохімічні, гістологічні, статистичні методи дослідження.

Розділ 3 присвячений порівняльному аналізу активності антиконвульсантів на різних моделях хемоіндукованих пароксизмів. Спочатку оцінювали протисудомну дію протиепілептичних засобів на моделі коразолових судом (коразол в дозі 90 мг/кг). При цьому за збільшенням ефективності препарати розташовані таким чином: ламотриджин < топірамат < габапентин < карбамазепін < вальпроат натрію. Надалі досліджували протисудомну дію цих препаратів на моделі бікукулінових (20 мг/кг) судом. У всіх тварин розвивалися клонічні судоми, у 75% – тонічні судоми. При цьому пригнічення судомного синдрому викликали всі препарати, окрім вальпроату натрію. Дещо активнішим, але недостатньо активним, виявився топірамат, ще трохи більш ефективнішим – ламотриджин. Найбільша дія встановлена у карбамазепіну та габапентину. На моделі судом, викликаних введенням каноїнової кислоти, спостерігали лише клонічні судоми і не ідентифікували суттєвої протисудомної активності досліджуваних препаратів. На моделі нікотинових судом за здатністю попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину препарати за збільшенням ефективності розташовані наступним порядком: топірамат < ламотриджин < габапентин < карбамазепін < вальпроат натрію. На фоні ареколінових судом препарати не попереджали прояви гіперсалівації і тремору. Тривалість латентного періоду тремору збільшується порівняно з контролем при введенні карбамазепіну і вальпроату натрію відповідно на 45,7% та 10,1%. Дія інших антиконвульсантів характеризується зменшенням



латентного періоду: габапентин зменшує його на 17,5%, ламотриджин – на 26,2%, топірамат – на 33,9%. Тривалість тремору збільшує вальпроат натрію на 4,1%, габапентин на 6,2%, карбамазепін, ламотриджин, топірамат зменшують тривалість тремору. В окремій серії дослідів з метою пошуку ефективного та безпечного антиконвульсantu проведено скринінг можливої протисудомної дії нової хімічної сполуки N-(біцикло[2,2,1]гепт-5-ен-ендо-2-іметил)-3-гідрокси-1,1-діоксотіоланіл-4-сульфоніламід. Дані цих дослідів показали, що ця речовина має досить виражений протисудомний ефект та транквілізуючу дію. В кінці розділу узагальнені дані щодо механізму дії та антиконвульсивної активності препаратів. Вальпроат натрію (стимулятор ГАМК-ергічних механізмів) при коразолових судом значно зменшував клонічні судом, середній бал судомного процесу, не викликав тонічних судом, летальних випадків. На моделі бікукулінових судом препарат не проявляв протисудомної активності, незначно зменшував летальність на тлі каїнової кислоти, мав найліпшу протисудомну дію та здатність попереджувати холіноміметичні ефекти нікотину. Препарат не попереджував появлення гіперсалівації та тремору при введенні ареколіну, а лише збільшував тривалість латентного періоду тремору порівняно з контролем на 10,1%. Карбамазепін, який посилює ГАМК-ергічні процеси та взаємодію з центральними аденозиновими рецепторами, не впливав на клонічні судом при введенні коразолу, однак суттєво зменшував частоту тонічних судом та летальність. Він мав найбільшу протисудомну активність на моделі бікукулінових судом та незначно зменшував 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 появлення гіперсалівації, але зменшував тривалість тремору. Топірамат, механізм якого полягає в інгібуванні глутаматергічних рецепторів та в активації ГАМК-рецепторів, не запобігав клонічним судомам і летальності при введенні коразолу та викликав збільшення середнього балу судом. Недостатньо потужним, але більш ефективним він проявляв себе на моделі бікукулінових судом колін, незначно знизив 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 є подібним до нейротрансміттеру ГАМК, але механізм дії якого відрізняється від інших засобів, що взаємодіють з ГАМК рецепторами, при коразолових судамах не запобігав клонічним судамам і летальності, викликав збільшення середнього балу судом, характеризувався найбільшою протисудомною активністю при введенні бікукуліну та не мав антипароксизмальної активності при введенні каноїнової кислоти. Габапентин на тлі нікотинових судом знижує частоту клонічних судом, однак і підвищує частоту тонічних судом. На моделі ареколінових судом застосування габапентину зменшувало латентний період тремору. Ламотриджин як блокатор вивільнення глутамату не запобігав клонічним судамам і летальності при введенні коразолу. На моделі бікукулінових судом ламотриджин виявився ефективнішим за топірамат, при використанні якого достовірно знижувалися бали судомного синудрому на 20%. Він не проявляв протисудомної активності при введенні канеїнової кислоти, однак знижував вдвічі частоту тонічних судом, летальність на 14,3%, бальність судомного синдрому на моделі нікотинових судом. Він найбільше серед досліджуваних антиконвульсантів здатен скорочувати тривалість тремору при ареколінових судамах.

Розділ 4 розкриває дослідження побічних ефектів антиконвульсантів. При визначенні психічної працездатності досліджено вплив антконвульсантів на когнітивні процеси в тесті УРПУ: при цьому ідентифікували здатність до навчання, консолідацію пам'ятного сліду, відтворення енграму пам'яті. Вивчали зміни емоційно-рухової активності тварин під впливом антиконвульсантів в тесті «відкрите поле». Спостереження показали, що введення тваринам ламотриджину, габапентину, вальпроату натрію, топірамату і карбамазепіну після навчання не вплинуло на пам'ять про негативний досвід, тобто латентний період перебування тварин в світлому відсіку не зменшився. Встановлено, що найменший вплив на відтворення енграм пам'яті має ламотриджин (60 мг/кг), при його введенні



відсоток тварин зі збереженим умінням склав 90%. Карбамазепін (200 мг/кг) істотно зменшував кількість тварин зі збереженим умінням (-60%), що вказує на його негативний вплив на енграм пам'яті. Депакін, топірамат і габапентин знизили здатність до навчання тварин на 30% та 20%. Найбільший негативний вплив на процеси відтворення енграм пам'яті має карбамазепін, найменший – ламотриджин. При вивченні зміни емоційно-рухової активності тварин під впливом антиконвульсантів в тесті «відкрите поле» визначили депримуєчу дію антиконвульсантів на орієнтовно-дослідницьку діяльність щурів. Найбільш виражена різниця у показниках горизонтальної рухової активності піддослідних щурів спостерігалася при введенні карбамазепіну, топірамату та вальпроату натрію. Найменший вплив на горизонтальну рухову активність мали ламотриджин та габапентин. При введенні карбамазепіну показник вертикальної рухової активності мав тенденцію до зменшення. Ламотриджин та габапентин також понизили вертикальну рухову активність тварин. Топірамат, вальпроат натрію, подібно до карбамазепіну, ламотриджину, хоча в меншому ступені, понизили вертикальну рухову активність. Всі досліджувані препарати також пригнічували норковий рефлекс, кількість умивань, актів дефекації, боліосів. Порівнюючи зміни орієнтовно-дослідницької реакції тварин у тесті «відкрите поле» за збільшенням пригнічення емоційно-рухової активності, досліджувані препарати розташувалися у наступній послідовності: габапентин < вальпроат натрію < топірамат < ламотриджин < карбамазепін. Визначення фізичної працездатності при застосуванні антиконвульсантів включало дослідження їх впливу на координацію рухів тварин у ротород тесті, пошуку міорелаксуючої дії антиконвульсантів в тесті «натягнутий лук», вплив протисудомних засобів на тривалість плавання з вантажем, гіпогенну дію дослідних препаратів. Встановлено, що габапентин володіє менш активним ніж карбамазепін, але суттєвим нейротоксичним ефектом. Щодо координації рухів, показник середнього латентного часу при застосуванні карбамазепіну зменшився на 65,28%, габапентну на 49,1%. Найбільш потужні міорелаксуючі властивості мають карбамазепін і вальпроат натрію. Більше інших препаратів зменшує тривалість плавання з вантажем вальпроат натрію. Пониження



часу тестів по впливу на фізичну працездатність показало, що найменше впливає ламотриджин, надалі в порядку зростання: габапентин, топірамат, вальпроат натрію. В той же час найбільш потужньо змінює фізичну працездатність карбамазепін. При дослідженні гіпногенної дії встановлено, що при попередньому введенні тіопенталу натрію найбільшу гіпногенну дію має карбамазепін, в меншій мірі вальпроат натрію та топірамат.

Розділ 5 присвячений впливу антиконвульсантів на молекулярно-біохімічні показники в умовах коразолового кіндлінгу. В першому підрозділі з'ясується вплив досліджуваних препаратів на показники тіол-дисульфідної системи. Встановлено, що в тканинах головного мозку при коразолових судом у щурів знижується рівень SH-груп, глутатіону відновленого, активності глутатіонредуктази та зростає вміст глутатіону окисненого. Вальпроат натрію та карбамазепін не чинять позитивного впливу на досліджувані показники, габапентин достовірно підвищує вміст глутатіону відновленого і проявляє тенденцію до зростання рівня сульфгідрильних груп. Найбільш виражений позитивний вплив на відновлення тіол-дисульфідної рівноваги спостерігався в групі тварин, яким вводили ламотриджин. Введення топірамату піддослідним тваринам викликало подібні біохімічні ефекти за спрямовністю, але менш виражені. Зважаючи на те, що депривація тіольної антиоксидантної системи в нейроні призводить до дискоординації в транспортній системі NO, надалі визначали вплив антиконвульсантів на показники системи оксиду азоту і розвиток нітрозуючого стресу. Імуногістологічними дослідженнями встановлено, що при моделюванні коразолових судом в сенсомоторній зоні кори головного мозку збільшується експресія індукцибельної і особливо нейрональної NO-синтази. Це веде до зниження біодоступності NO та його перетворення в пероксинітрит, про що свідчить підвищення в цитозольній фракції гомогенату головного мозку нітротирозину. Профілактичне призначення тваринам паралельно з моделюванням коразолового кіндлінгу протисудомних засобів призводило до різної вираженості зниження експресії нейрональної і індукцибельної NO-синтази, про що свідчило зниження щільності обох синтаз в сенсомоторній зоні кори головного мозку щурів.



Найбільш виражена дія відносно зниження експресії і обох досліджуваних ізоформ NO-синтази при коразолових судах спостерігали при введенні ламотриджину. Вальпроат натрію в меншому ступені знижував експресію обох ізоформ NO-синтази, топірамат більш виражено впливав на індукцибельну NO-синтазу, ніж на нейрональну. Габапентин і особливо карбамазепін чинили помірну за вираженістю дію на експресію досліджуваних ізоформ NO-синтази. За ступенем зниження маркеру нітрозуючого стресу нітротирозину антиконвульсанти розташовані в наступному порядку: ламотриджин > топірамат > вальпроат натрію > габапентин > карбамазепін. Зниження експресії нейрональної та індукцибельної NO-синтази під дією агоністів ГАМК вальпроату натрію та частково топірамату можливо пов'язана з механізмом активації ГАМК- рецептора протисудомними препаратами. Висока активність топірамату та ламотриджину за умов гальмування реакцій нітрозуючого стресу здійснюється з гальмуванням експресії обох форм NO-синтази і відновленням тіол-дисульфідної рівноваги. Найбільший нейропротективний ефект препарату продемонстрований при розрахунку коефіцієнту нітротирозину/відновлений глутатіон. Ламотриджин і топірамат знижували індекс нейродеструкції в 4 та 2 рази відповідно на відміну від інших антиконвульсантів. Проведені морфометричні дослідження показують, що коразолові судами супроводжуються зниженням щільності нейронів сенсомоторної кори головного мозку, пригніченням в них транскрипційних процесів (пониження рівня РНК) і підвищенням щільності клітин з ознаками апоптозу на тлі вираженого дефіциту антиапоптотичного білка bcl-2. Введення профілактичним курсом ламотриджину, топірамату, вальпроата натрію і габапентину призводило до достовірного підвищення щільності нейронів сенсомоторної кори. Лідером в цьому відношення був ламотриджин, на другому місці – вальпроат натрію, третє місце поділили топірамат і габапентин. Карбамазепін чинив незначну дію відносно цього показника. Досліджувані антиконвульсанти не тільки знижували загибель нейронів, а й зберігали їх функціональну активність, про що свідчило підвищення під їх впливом рівня РНК в нейронах кори. Препарати знижували щільність апоптотичних клітин і підвищували рівень антиапоптотичного білка bcl-2. Лідером



антиапоптичної дії був ламотриджин, на другому місці – вальпроат натрію, за третє місце конкурували топірамат і габапентин.

В розділі «Узагальнення та аналіз отриманих результатів» диференційовано обговорюються різні синаптичні механізми як фармакологічні мішені для дії антиконвульсантів. Визначені шляхи індивідуалізації протисудомної медикаментозної терапії в умовах підвищеної судомної готовності мозку. Головний зміст роботи висвітлений у висновках.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дослідженнями вперше встановлено, що коразоловий кіндлінг супроводжується зменшенням тіолдисульфідної системи за рахунок зниження її відновлених інтермедіатів, значного падіння рівня цитозольного глутатіону і придушення активності глутатіонредуктази. При інгібуванні глутатіонредуктази в умовах судомних нападів відбувається окислювальна модифікація низькомолекулярних тіолів, утворення гомоцистеїну і як наслідок порушення транспорту NO з утворенням його цитотоксичних дериватів, які ще більше підсилюють окислювання тіолів. Депривація тіольної антиоксидантної системи в нейроні призводить до дискоординації в транспортній системі NO і до зниження резистентності клітини до нітрозуючого стресу – найбільш раннього нейродеструктивного механізму в умовах судомних нападів та загибелі нейронів. Вперше показано, що епілептиформні судоми супроводжуються значною депривацією тіол-дисульфідної системи та активацією нітрозуючого стресу та пригніченням когнітивно-мнестичних функцій. Антиконвульсанти, які підвищують рівень відновлених еквівалентів тіол-дисульфідної системи й інгібують нітрозуючий стрес, мають менш виражені побічні ефекти у відношенні до когнітивних функцій.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведених досліджень є передумовою обґрунтування раціональних підходів до медикаментозної терапії епілепсії з урахуванням механізмів дії антиконвульсантів та їх побічної дії. Результати дисертаційної роботи також впроваджені у навчальний процес 6 кафедр фармакології вищих навчальних медичних закладів України.



**Повнота викладення матеріалу в опублікованих роботах.** За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових робіт, в яких повною мірою відображено її зміст, в тому числі 6 статей, з них 5 – у наукових фахових журналах, рекомендованих ВАК України, 1 – в закордонному виданні, 10 тез у матеріалах з'їздів, конгресів, науково-практичних конференцій та симпозіумів, 1 патент України, 2 інформаційних листи.

**Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту та оформлення.** Незважаючи на новизну, практичну значимість, достатній методичний рівень, об'єм досліджень, при роботі з дисертацією та авторефератом виникли деякі зауваження, побажання та запитання, на які б хотілося почути відповідь дисертанта:

1. Доцільно у вступі уникнути цитування авторів досліджень, а вказати номери джерел.
2. Розширити наукову новизну за рахунок внесення результатів гістохімічних методів дослідження.
3. Уніфікувати об'єкт і предмети дослідження в дисертації та авторефераті, а також всюди зазначити про внутрішньоочеревинний шлях введення антиконвульсантів.
4. В таблицях порівнювати зміни патобіохімічних показників спочатку при коразолових судомомах з інтактним контролем, а потім при введенні препаратів з показниками при коразолових судомомах.
5. В роботі зустрічаються друкарські помилки (ст. 10, 22, 24, 43, 63, 64, 70, 118, 122) та русизми (9, 24, , 89, 90, 92, 93), не всі джерела літератури оформлені за правилами.

Незважаючи на повноту викладення матеріалу, до дисертації виникли наступні питання, на які хотілося б почути відповідь дисертанта:

1. Чи існують результати досліджень впливу антиконвульсивних засобів на показники ексайтотоксичності?



2. Чи проводили ви досліді або існують літературні дані щодо впливу антиконвульсантів на наступні показники прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу (маркери окиснювальної модифікації білків, перекисного окиснення ліпідів, антиоксидантні ферменти, крім показників глутатіонової системи)?
3. Досліджували ви чи існують літературні дані щодо впливу антиконвульсантів на окремі тіолвмісні показники – вміст цистеїну, метіоніну, гомоцистеїну?

Висловлені зауваження та питання не є принциповими та не понижують наукову і практичну цінність дисертації.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертація Шастун Н.П. «Аналіз механізмів співвідношення протисудомної активності та побічної дії антиконвульсантів різних груп» являє собою закінчену роботу, виконана на хорошому методичному рівня з залученням достатньої кількості тварин. Робота має наукову новизну щодо раціоналізації медикаментозної терапії епілепсії завдяки урахуванню ефективності і безпечності протисудомної терапії. Робота володіє практичним значенням, тому що обґрунтовує раціональні підходи до медикаментозної терапії епілепсії з урахуванням механізму дії антиконвульсантів та побічної дії. Таким чином, за актуальністю проблеми, новизною, практичним значенням, ступенем опублікування та загальним науковим рівнем робота повністю відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженим Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013р. №567 (зі змінами), які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор Шастун Наталя Петрівна заслуговує на присудження ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Професор кафедри фармакології

Національного медичного

університету імені О.О. Богомольця

д.мед.н., професор



Горчакова Н.О.