

ВІДЗИВ ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію Цивуніна Вадима Володимировича

«Пошук нових антиконвульсантів рослинного походження (експериментальне дослідження)», подану до спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми дисертації. У світі людство поступово переходить від м'язового періоду індустріалізації до фази інтелектуального удосконалення з підвищенням потреб і навантаженням не на скорочувальну силу м'язів, а на організацію нейрональних мереж головного мозку. Перевтома, хронічний стрес, надмірні психоемоційні навантаження, а також несприятливий вплив різноманітних екзогенних факторів (чинники навколишнього середовища, зловживання алкоголем та тютюном тощо) провокують неадекватну реакцію мозку у вигляді розвитку таких патологічних станів як епілепсія, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера тощо. Низка внутрішніх біологічних чинників, зокрема розбіжності в сімействі генів цитохромів Р-450, глікопротеїну Р та інших транспортних білків, обумовлюють розвиток резистентних форм епілепсії, на які страждають біля 20-35% хворих. З іншого боку, у пацієнтів, що тривалий час (кілька років) приймають антиепілептичні засоби, з'являється низка побічних ефектів, з якими треба боротись новими групами препаратів, тому що відміна протисудомної терапії здійснюється тільки після тривалої, протягом декількох років, ремісії.

Усі ці факти викликають настійну необхідність пошуку нових, більш ефективних і безпечних протиепілептичних засобів (ПЕЗ). Найкраще відповідають цим критеріям препарати на рослинній основі, тому актуальність теми дослідження не викликає жодних сумнівів. Особливо цінною є робота, виходячи з усвідомлення, що подібні дослідження в Україні не проводились, а на світовому фармацевтичному ринку препарати рослинного походження взагалі відсутні.

З наведеного випливає, що тема дисертаційної роботи надзвичайно актуальна і має як важливе теоретичне, так і беззаперечне суттєве практичне значення, особливо коли пошук ведеться серед зовсім нових рослин, які раніше не підлягали вивченню за подібними властивостями.

Зв'язок роботи з науковими державними та галузевими програмами і планами. Дисертація виконана за планом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету, затвердженим МОЗ України, «Фармакологічне дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці» (номер держреєстрації 0103U000478), «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956), у якій дисертант був співвиконавцем.

Основний зміст дисертації та його оцінка. Дисертація побудована за класичною схемою і являє собою рукопис, викладений на 183 сторінках (з яких 144 сторінки основного тексту), до якого увійшли вступ, розділи «Огляд літератури», «Матеріали та методи дослідження», 5 розділів результатів власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, висновки та список використаних джерел літератури (358 найменувань, з яких кирилицею – 52, латиницею – 306).

Дисертація написана гарною українською мовою. Робота викладена логічно, усі розділи відповідають поставленій меті й задачам, супроводжуються доказовими ілюстраціями і критичним аналізом та порівнянням власних результатів з отриманими в інших лабораторіях. Наприкінці кожного розділу приведені власні публікації з проблеми.

У *вступі* дисертант зробив короткий виклад сучасного бачення актуальності теми, провів порівняльний аналіз рослинних антиконвульсантів з існуючими синтетичними ПЕЗ, посилаючись на останні джерела з цієї проблеми як у світі, так і в Україні, сформулював мету дослідження та визначив 7 підпорядкованих їй задач, встановив об'єкт і предмет дослідження, навів наукову новизну та практичне значення результатів.

Повна аргументація актуальності дисертації для медицини і, зокрема, епілептології, наведена в *розділі 1* – «Огляд літератури». У трьох підрозділах: «Сучасні протиепілептичні лікарські засоби: механізми дії, особливості застосування, недоліки», «Лікарські рослини та їх біологічно активні речовини, що чинять протисудомну дію» та «Фармакологічна взаємодія рослинних засобів та біологічно активних речовин рослинного походження з класичними антиконвульсантами. Обґрунтування застосування фітопрепаратів у допоміжній терапії епілепсії» викладено основні аргументи на користь рослинних екстрактів, визначено їх позитивні властивості та доведено перспективність застосування рослин як компонентів допоміжної терапії судомних станів.

У *розділі 2* викладені класичні й нові методичні особливості роботи, наведені прийоми вивчення різних аспектів поведінки тварин під впливом фітопрепаратів для визначення властивостей досліджуваних екстрактів як у нормі, так і за різних екстремальних станів (черепно-мозкова травма, амнезія, гіпоксія тощо). Методичний рівень роботи є адекватним поставленим задачам.

При обробці отриманих результатів використані сучасні та адекватні статистичні методи, проведено кореляційний аналіз не лише кількісних (із використанням коефіцієнту Спірмена), але й якісних (із розрахунком тетрагоричного показника асоціації) показників.

Розділи 3–7 повністю присвячені викладенню результатів власних досліджень дисертанта.

У *розділі 3* наведено результати скринінгу 56 із надземної частини 25 видів рослин 9 родин на протисудомну активність. Для визначення «лідерів» за антиконвульсивною активністю використано базову скринінгову модель пентилентетразолових (коразолових) судом у мишей. Загалом за результатами первинного скринінгу визначено 14 екстрактів із виразною протисудомною дією, 10 екстрактів із проконвульсивними властивостями та 32 екстракти без виразного впливу на пентилентетразолові судоми. Серед 14 антиконвульсантів особливої уваги заслуговують сухі екстракти ліщини звичайної, рутки Шлейхера, базилику камфорного та кропиви собачої, що чинили найвиразніший

протисудомний ефект за впливом на більшість показників експериментальних судом.

Розділ 4 присвячений визначенню протиепілептичної активності «лідерів» попереднього скринінгу на моделях судом із різних патогенезом (пікротоксинові, тіосемікарбазидні, стрихнінові, камфорні). Для сухих екстрактів рутки Шлейхера (СЕРШ) та базиліку камфорного (СЕБК) як фітопрепаратів, що чинили позитивний ефект за більшості експериментальних моделей судом, додатково визначено ефективність за умов електроіндукованих пароксизмів (максимальний електрошок) та хронічного епілептогенезу (пентилентетразоловий кіндлінг), а також їх фармакодинамічну взаємодію із найуживанішим антиконвульсантом вальпроатом натрію. Для СЕРШ як найперспективнішого засобу досліджено дозозалежність антиконвульсивної дії, а також роль окремих біологічно активних речовин у реалізації протисудомного ефекту сумарного екстракту. Визначено, що кожен із досліджуваних сухих екстрактів має свій власний спектр протисудомної дії. Доведена висока ефективність СЕРШ на моделі пентилентетразолового кіндлінгу, що є предиктором високого протиепілептичного потенціалу. Встановлено, що виразні протисудомні властивості СЕРШ обумовлені синергізмом його окремих біологічно активних речовин. Експериментально обґрунтовано доцільність комбінованого застосування вальпроату натрію та СЕРШ.

У *розділі 5* викладено результати поглибленого вивчення нейротропних властивостей рослинних антиконвульсантів – «лідерів» у звичайних умовах (поведінкові тести відкритого поля, стрижня, що обертається, піднесеного хрестоподібного лабіринту, підвішування мишей за хвіст) та на фоні дії екстремальних факторів (черепно-мозкова травма, амнезія, гіпоксія тощо). Доведено сприятливий профіль супутніх психотропних властивостей у СЕРШ (анксіолітичний, антиамнестичний, церебропротекторний ефекти), відсутність нейротоксичного впливу у СЕРШ та СЕБК.

Розділ 6 присвячений експериментальному аналізу нейрохімічних механізмів антиконвульсивної дії «лідера» – сухого екстракту рутки Шлейхера. Встановлено, що нейротропна, зокрема, й антиконвульсивна дія сухого

екстракту рутки Шлейхера реалізується через втручання у баланс церебральних трансмітерних амінокислот. Це доведено за збільшенням рівня гальмівного медіатора ГАМК та зменшенням вмісту збуджувальних месенджерів глутамату та аспартату. Крім того, встановлено вплив сухого екстракту рутки Шлейхера на нейротрофінову та цитокінову ланки розвитку експериментальних судом у тварин за зниженням пентилентетразол-індукованої оверекспресії фактора росту нервів і прозапальних цитокінів IL-1 β та TNF- α , а також зростанням вмісту протизапального IL-4 у головному мозку мишей.

У розділі 7 наведені результати дослідження гострої токсичності сухого екстракту рутки Шлейхера. На двох видах тварин (миші, щури) встановлено високий ступінь нешкідливості фітопрепарату за внутрішньошлішкового введення.

Окремо подано узагальнення результатів експериментів та їх авторський аналіз. Розділ засвідчує ерудицію дисертанта, представляє логіку усього дослідження, чітко визначає переваги застосування фітопрепаратів як перспективних антиконвульсантів та ще раз вказує на практичну значущість проведеної роботи. Особливої уваги заслуговує ґрунтовний аналіз залежності протисудомної дії фітоекстрактів від їх якісного та кількісного складу. Визначено фундаментальні закономірності зв'язку «фармакологічний ефект – хімічний склад» для фітоантиконвульсантів, що полягає у наявності флавоноїду рутину, із зростанням кількості якого в екстракті протисудомні властивості посилюються.

Загальні висновки вдало сформульовані та дають можливість уявити об'єм і суть усієї дисертації.

Список джерел літератури складений відповідно до чинних вимог та містить більш ніж достатню кількість посилань.

Наукова новизна результатів не підлягає сумніву. В.В. Цивунін вперше теоретично та експериментально обґрунтував доцільність розробки протисудомних засобів серед об'єктів рослинного походження. Дисертант вперше визначив наявність зв'язку між впливом фітопрепаратів на судомний синдром та особливостями їх хімічного складу. Для сухих екстрактів рутки Шлейхера, базилику камфорного, кропиви собачої та ліщини звичайної вперше

встановлено спектр антиконвульсивної дії. Для сухих екстрактів рутки Шлейхера та базиліку камфорного додатково визначено високий протиепілептичний потенціал. Вперше для сухого екстракту рутки Шлейхера встановлено сприятливий спектр супутніх психотропних властивостей, зокрема анксиолітичний, антиамнестичний та церебропротекторний ефекти, визначено механізми його нейротропної дії, що полягають у зміні церебрального балансу збуджувальних та гальмівних амінокислот (у бік збільшення останніх), а також у втручанні в цитокінову на нейротрофічну ланку епілептогенезу. Експериментально показано нешкідливість сухого екстракту рутки Шлейхера (V клас токсичності), що передбачає перспективність створення на основі екстракту нових активних фармацевтичних інгредієнтів для розробки вітчизняних антиконвульсивних лікарських препаратів.

Результати дослідження послужили основою для 2 патентів на винахід «Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу із протисудомною дією» (№ 106117 від 25.07.2014 р.) та «Застосування лікувально-профілактичного засобу в формі сухого екстракту рутки Шлейхера як агента, що проявляє анксиолітичну дію» (№ 110947 від 10.03.2016 р.) та 2 патентів на корисну модель: «Лікувально-профілактичний засіб із протисудомною дією» (№ 79433 від 25.04.2013 р.) і «Лікувально-профілактичний засіб з анксиолітичною дією на основі рослинної сировини» (№ 89372 від 25.04.2014 р.). Ці патенти підтверджують наукову новизну дисертації.

Практичне значення одержаних результатів. Значення результатів дисертації для практичної медицини можна оцінити з декількох сторін. Головним можна вважати те, що дисертанту вперше вдалося довести, що у складі активних рослинних протиепілептичних препаратів наявна велика кількість флавоноїду рутину. Це може бути основою фітохімічного прогнозу та експериментальним обґрунтуванням на пряму пошуку перспективних антиконвульсантів рослинного походження із урахуванням якісного та кількісного вмісту в окремих групах біологічно-активних речовин у фітосубстанціях.

Результати роботи послужили підставою для видання 2 інформаційних листів МОЗ про нововведення в сфері охорони здоров'я: «Використання сухого екстракту рутки Шлейхера для розробки лікарського засобу протисудомної дії» (№ 282-2013, 2013 р.) та «Інноваційні перспективи використання сухого екстракту листя ліщини звичайної для розробки лікарського засобу протисудомної дії» (№ 45-2016, 2016 р.).

Окремі фрагменти дисертації впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету (м. Запоріжжя), фармакології Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці), фармакогнозії та технології ліків Одеського національного медичного університету (м. Одеса), фармації Таджикицького національного університету (м. Душанбе).

Сухий екстракт рутки Шлейхера, який виявив високу антиконвульсивну активність при більшості експериментальних моделей пароксизмів, а також за умов експериментального хронічного епілептогенезу, планується до впровадження в промислове виробництво як протисудомний лікарський засіб на ТОВ «ДКП „Фармацевтична фабрика“», м. Житомир, на що є відповідний акт від 06.09.2016 р.

Сухий екстракт з трави базиліку камфорного планується впровадити в промислове виробництво як дієтичної добавки для корекції розладів ЦНС на ТОВ «Дослідний Завод «ГНЦЛС» (акт впровадження від 21.06.2016 р.).

Листя ліщини звичайної у вигляді сухого екстракту впроваджується в промислове виробництво як дієтична добавка для корекції розладів ЦНС на ТОВ «Дослідний Завод «ГНЦЛС» (акт впровадження від 21.06.2016 р.).

Отже, рівень впровадження є цілком достатнім для кандидатської дисертації.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Робота обґрунтована аналізом результатів досліджень, проведених на адекватній кількості лабораторних тварин із застосуванням широкого спектру традиційних та нових методичних прийомів. Досліди виконано на 1262 білих рандомбредних мишах та 48 білих

рандомбредних щурах. Широкий діапазон використаних методів свідчить про великий об'єм доклінічного вивчення фармакологічних властивостей екстрактів. Коректна статистична обробка даних із використанням сучасного програмного забезпечення дозволила отримати результати, достовірність яких не підлягає сумніву. Матеріали дисертаційної роботи викладені логічно та послідовно, отримані результати є цілком репрезентативними, гарно ілюстровані таблицями кількісних даних, рисунками. Узагальнення, аналіз і висновки дисертації повністю відповідають результатам експериментальних досліджень.

Отже, всі наукові положення та висновки дисертації є обґрунтованими та достовірними.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях і в авторефераті. За темою дисертації опубліковано 22 наукові роботи, зокрема 10 статей, серед яких 8 у фахових журналах, рекомендованих МОН України, 2 – у закордонних фахових виданнях (у тому числі 1 стаття у виданні, включеному до наукометричних баз Scopus та Web of Science), 6 тез доповідей на наукових конференціях різного рівня. Отримано 2 патенти України на винахід і 2 патенти України на корисну модель. Публікації віддзеркалюють основні результати досліджень В.В. Цивуніна. Автореферат відповідає дисертації за змістом та структурою.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту і оформлення. Дисертацію та автореферат В.В. Цивуніна написано гарною українською мовою із дотриманням наукового стилю. Повністю позитивно характеризуючи роботу в цілому, слід звернути увагу на такі зауваження:

1. На нашу думку, було б варто в огляді літератури навести існуючі фармакологічні шляхи лікування епілепсії з використанням лікарських засобів, що діють на антиоксидантній основі. Тому що рослини, які мають антиоксидантну активність, зазвичай ефективні як ПЕЗ.
2. Перелік видів рослин, які в переважній більшості є закордонними і не зустрічаються в Україні, на нашу думку менш доцільний, і без нагальної необхідності може бути видалений. Краще навести рослини, які ростуть та

культивуються в Україні і можуть бути першочерговим об'єктом для наукового вивчення, а також сировиною для виготовлення лікарських засобів.

3. Зайвим слід вважати перелік в огляді літератури інших, крім антиепілептичної, видів дії рослинних сполук, що не має першорядного значення для теми дисертації.

Однак, зазначені зауваження не мають принципової важливості і не впливають на загальну високу позитивну оцінку роботи.

В рамках дискусії хотілося б почути відповідь на такі *запитання*:

1. Якщо узагальнити Ваші експериментальні результати, чи можна вважати, що рослинні антиконвульсанти доцільно використовувати як основні засоби у лікування епілепсії?
2. У чому Ви бачите основні переваги рослинних протисудомних засобів порівняно із синтетичними ПЕЗ?
3. Чи вважаєте Ви за доцільне впровадження у медичну практику комбінованих синтетичних та рослинних ПЕЗ?

На основі проведеного аналізу матеріалів дисертації можна зробити висновок, що дисертаційна робота Вадима Володимировича Цивуніна «Пошук нових антиконвульсантів рослинного походження (експериментальне дослідження)» є цілком завершеною працею, де виконана поставлена мета і вирішені всі поставлені задачі. Виявлено декілька активних рослинних екстрактів, серед яких найбільш виразну антиконвульсивну дію має сухий екстракт рутки Шлейхера, що виявив здатність впливати на різні механізми розвитку епілепсії. Цей екстракт «лідер» відповідає основним вимогам до сучасних антиконвульсантів і може бути запропонований як прототип вітчизняного лікарського препарату для профілактики й лікування різних видів епілепсії – додатково до існуючих синтетичних протисудомних засобів.

За актуальністю теми та її експериментальним вирішенням, сучасним науково-методичним рівнем, виконаним обсягом проведених досліджень, науковою новизною, а також високою практичною значущістю основних положень та висновків, дисертаційна робота Цивуніна Вадима Володимировича повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів»,

затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. із змінами згідно з Постановою КМУ № 656 від 19.08.2015 р., які ставляться до кандидатських дисертацій, а дисертант заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент,
старший науковий співробітник
лабораторії медико-біологічних досліджень
відділу хімії фосфоранів
Інституту органічної хімії НАН України,
доктор медичних наук, професор



О.К. Ярош

