ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора, завідувачки кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова Волощук Наталії Іванівні на дисертаційну роботу Танцури Євгена Олександровича «Експериментальне дослідження ефективності протиепілептичних препаратів у лікуванні судом у мишей з корнеальним кіндлінгом на тлі потенційної модуляції ферментів системи цитохрому Р450» поданої до разової спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.081 при Національному фармацевтичному університеті, затвердженої наказом Національного фармацевтичного університету від 22.12.2023 р. № 116-Адм. про проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

Ступінь актуальності обраної теми дисертації.

Епілепсія являє собою не тільки медичну, а й важливу соціальну проблему, вагомість якої визначається великою поширеністю захворювання і його наслідками. Особливе місце (за своєю значущістю та гостротою) займають питання, пов'язані з резистентністю епілепсії до терапії, тобто – фармакорезистентність захворювання.

Останніми десятиліттями було досягнуто значного прогресу в галузі діагностики епілепсії, а також – в галузі лікування, що базується на синтезі цілої низки нових ефективних та більш безпечних протиепілептичних препаратів.

В той же час, відсоток резистентних до терапії випадків протягом тривалого часу залишається практично незмінним та визначається більшістю авторів на рівні близько 30 %, що робить актуальним подальший науковий пошук

в напрямку визначення причин розвитку, прогресування фармакорезистентності та шляхів її попереджання і подолання. До об'єктивних причин фармакорезистентності відносять також ті, які пов'язані з біологічними особливостями організму, перш за все, з особливостями обміну протиепілептичних препаратів, що викликані недосконалістю функціонування певних ферментів системи цитохрому Р450 внаслідок поліморфізмів відповідних генів.

Тому дисертація Танцури Євгена Олександровича «Експериментальне дослідження ефективності протиепілептичних препаратів у лікуванні судом у мишей з корнеальним кіндлінгом на тлі потенційної модуляції ферментів системи цитохрому Р450», яке розширює уявлення про таку складну і багатогранну проблему, як фармакорезистентна епілепсія (ФРЕ), зокрема підходів до підбору препаратів для лікування з урахуванням генетичного поліморфізму ферментів цитохрому Р450, є своєчасним та актуальним.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами та планами.

Дисертаційна робота виконана у межах запланованої науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956).

Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача

Дисертантом проведено інформаційно-патентний пошук, у роботі проаналізовано 218 джерел зарубіжної і української літератури переважно за останнє десятиріччя. У роботі коректно сформульована мета, для реалізації якої були поставлені чіткі завдання і адекватно підібрані сучасні методи дослідження і аналізу даних. Отже, науковий рівень дисертації за поставленими завданнями і використаними методиками досліджень передовим, сучасним і адекватним. Отримані результати є достовірними і науково обгрунтованими.

За матеріалами дисертації опубліковано19 наукових праць, 9 у вітчизняних та міжнародних виданнях фахового спрямування, (з них 2 статті у журналах, що індексуються в Scopus), отримано 1 патент України на корисну модель. В цих роботах повністю висвітлено всі положення дисертації. Основні результати дослідження були представлені та обговорені на наукових форумах різного рівня - науково-практичних конференціях, з'їздах, конгресах в Україні та за її межами.

Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях.

В межах проведеного дослідження автор вперше в Україні проаналізував результати фармакогенетичного тестування з визначенням поліморфізмів генів системи цитохрому Р450 - *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4,* які контролюють біотрансформацію протиепілептичних препаратів (ПЕП), у 116 дітей з істинно ФРЕ. Аналіз показав надзвичайно високу розповсюдженість окремих однонуклеотидних поліморфізми та їх комбінацій, які пов'язують зі сповільненим метаболізмом - у 75 пацієнтів (64,66 %). Так, частота алельних варіантів *CYP3A4*1B* та *CYP2C19*2* у пацієнтів з ФРЕ достовірно перевищувала ($p < 0,05$) їх наявність в загальній українській та інших європейських популяціях. Частота поліморфізму *CYP2C19*2* у обстежених пацієнтів була також достовірно вищою ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідними (діти з резистентною до лікування епілепсією) даними російських і турецьких дослідників.

Вперше з метою визначення найбільш ефективних ПЕП серед тих, які найчастіше використовують для лікування епілепсії (карбамазепін, натрію вальпроат, ламотриджин, сультіам, леветирацетам) в тому числі її фармакорезистентних форм, у пацієнтів з можливими особливостями з боку метаболізму (прискорений, сповільнений, нормальний) запропонована модифікована експериментальна модель корнсального кіндлінга (Koneval et al., 2018) на тлі потенційної модуляції ферментів цитохрому Р450 за допомогою

індуктора (карбімазепін), інгібітора (сультіам) або без впливу на ферментну систему печінки (контрольна група).

У дисертації вирішено всі поставлені завдання, проведений скрупульозний і всебічних аналіз отриманих даних, сформульовані висновки, які є повними і науково обґрунтованими. В опублікованих наукових працях здобувача повністю викладені результати дисертаційного дослідження, наукові положення, висновки і практичні рекомендації, які випливають із них.

Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Основні положення дисертаційної роботи відповідають пріоритетному напрямку розвитку медицини, зокрема фармакотерапії фармакорезистентної епілепсії, заплановані та виконані на високому сучасному методичному рівні.

Автором використані сучасні інформативні методи дослідження, які включали поряд з традиційними, рекомендованими Міжнародною протиепілептичною лігою (ILAE), аналіз результатів фармакогенетичного тестування 116 пацієнтів з ФРЕ. Родзинкою дисертаційного дослідження було вивчення ефективності традиційних ПЕП, які найчастіше застосовуються при лікуванні епілепсії (карбамазепіну, вальпроату натрію, леветирацетаму, сультіаму, ламотриджину) на моделі ФРЕ у мишей на тлі потенційної модуляції ферментів CYP450 за допомогою індуктора (карбамазепін), інгібітора (сультіам) та порівняння отриманих результатів з результатами в контрольній групі. Використані методи дослідження повністю відповідають меті та поставленим завданням. Матеріал у роботі поданий у вигляді інформативних таблиць, схем, рисунків, що дає можливість підкреслити обґрунтованість та достовірність результатів цієї дисертаційної роботи.

Таким чином, достатня кількість проаналізованих результатів фармакогенетичного тестування, експериментальне дослідження, правильний вибір сучасних методів статистичного аналізу отриманих результатів, їх клінічне

тлумачення, дали змогу автору дисертації на засадах доказової медицини обґрунтувати основні положення, висновки і практичні рекомендації.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.

Наукові завдання, які дисертант поставив в своїй роботі, повністю розв'язані в ним на високому науковому рівні. Для кожного завдання підібрані оптимальні методи дослідження, які дозволили отримати достовірні результати. В роботі для обробки отриманих даних використані сучасні високоінформативні методи. Таким чином, дисертація написана на високому науковому рівні, здобувач оволодів методологією наукової діяльності і доводить отримання кваліфікації, необхідної для сучасного дослідника.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Теоретичне значення отриманих результатів полягає в тому, що на основі проведеного експериментального дослідження виявлено, що попереднє введення карбамазепіну та сультіаму по різному впливає на протисудомну активність низки препаратів, які традиційно застосовуються в клінічній практиці для лікування епілепсії. Карбамазепін у дозах 7 і 12 мг/кг не виявляв протисудомного ефекту (4,42 ± 0,25, 4,44 ± 0,32 бала) у групі тварин, які приймали карбамазепін під час формування судом за допомогою електростимцляції. Попереднє призначення сультіаму (50 мг/кг) суттєво підвищувало притисудомний ефект ПЕП в порядку зменшення: сультіам > ламотриджин > вальпроат натрію.

Результати дослідження суттєво доповнили наукові знання, щодо впливу попереднього лікування (при підборі ПЕП) та особливостей організму пацієнта, зокрема активності його ферментної системи на ефективність лікування епілепсії.

Дисертаційне дослідження Танцури Євгена Олександровича має суттєве **практичне значення**, оскільки в ньому науково обґрунтовано та рекомендовано для впровадження в заклади охорони здоров'я проведення фармакогенетичного

тестування для пацієнтів з ФРЕ, з метою визначення алельних варіантів генів цитохрому Р450 *CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4*, що кодують відповідні ферменти, більш активне включення до терапевтичної схеми препаратів, в метаболізмі яких цитохроми Р450 не беруть участі; перегляд схеми лікування в напрямку скасування (або зменшення дози) традиційно «базових» АЕП за наявності поліморфізмів генів, що кодують цитохроми, які здійснюють та сповільнюють їх метаболізм.

Розуміння отриманих результатів експериментального дослідження дають можливість заздалегідь оцінити ефективність комбінованого використання різноманітних ПЕП, прогнозувати доцільність вибору при підборі терапії.

Проаналізовані результати генетичного тестування дозволяють персоніфікувати лікування дітей з фармакорезистентною епілепсією. Такий підхід дозволяє рекомендувати адекватне лікування не тільки з урахуванням форми епілепсії, характеру нападів, етіології, віку, статі, але й з особливостями метаболізму. При підборі протисудомної терапії необхідно враховувати попереднє лікування, яке може додатково впливати на метаболізм ксенобіотиків, в тому числі ПЕП. Отримані дані лягли в основу патенту на корисну модель «Спосіб лікування дітей з фармакорезистентними епілепсіями», де дисертант є співавтором.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Зміст дисертації Танцури Є.О. викладено українською мовою на 160 сторінках друкованого тексту (основний текст – 112 сторінок). Робота побудована за традиційною схемою, складається із анотації (українською та англійською мовами), вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, списку літературних джерел – всього 218, з них 15 кирилицею, 203 латиницею. Дисертація містить 14 рисунків та 17 таблиць.

В **анотації** стисло показана актуальність проведеного дослідження, сформульовані мета та завдання, визначені об'єкт та предмет дослідження, описані основні отримані результати, їх наукова новизна та практичне значення. Всі підрозділи викладені згідно існуючих вимог.

У **вступі** дисертант обґрунтовує актуальність теми дисертаційної роботи, чітко визначає напрямок наукового дослідження, формулює мету та завдання дослідження, обговорює об'єкт та предмет дослідження, висвітлює наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Дисертант наводить дані про апробацію дослідження, власні публікації відповідно до теми дисертації, а також, яким чином проводилося впровадження результатів в практику.

У **1 розділі** «Сучасний стан проблеми фармакорезистентних епілепсій, підходи до діагностики та лікування» (огляд літератури) автором дисертаційного дослідження висвітлені ключові моменти, що стосуються термінології, епідеміології та класифікації епілепсії, зокрема фармакорезистентних її форм. Окремо дисертант розглядає вплив різних чинників на перебіг епілепсії, теоріях формування фармакорезистентності. Підкреслюючи багатофакторність у виникненні фармакорезистентності, автор докладно висвітлює одну з гіпотез, а саме вплив генетичних особливостей ферментної системи цитохрому Р50 на ефективність лікування епілепсії, її перебіг та роль у виникненні фамакорезистентності.

Особливо цікавими є підрозділ, що стосуються лікування ФРЕ, індивідуальному підбору ПЕП з урахуванням генетичних особливостей окремого індивідуума.

Огляд літератури відображає стан проблеми та демонструє актуальність обраної теми. Розділ написаний послідовно, є достатньо глибоким, завершується резюме, в якому висвітлено ключові моменти щодо того, які питання

залишаються на теперішній час ще не вирішеними та потребують подальших досліджень.

У **розділі 2** відображені матеріал та методи дослідження.

Проведена дослідження складається з 2-х складових: експериментальної і клінічної частин.

В експериментальній частині розділу наведено дизайн та основні етапи виконання роботи, які свідчать про виважений методичний підхід до проведення дослідження.

Дисертант обґрунтовує вибір моделі корнеального кіндлінгу та відтворює фармакорезистентну епілепсію у 60 білих мишей лінії BALB/c вагою 17-20 г. з одночасною потенційною зміною активності ферментативної системи цитохрому Р450 завдяки субхронічному введенню ПЕП карбамазепін/сультіам в субефективних дозах, які є індукторам/інгібіторам зазначеної системи. Після формування судом силою не менше ніж 5б, проводилося послідовне введення ПЕП з визначенням їх ефективності в залежності від попереднього введення індуктора чи інгібітора.

В клінічній частині роботи проведено аналіз клініко-анамнестичних даних, фенотипічних особливостей нападів та результати фармакогенетичного тестування у 116 дітей – (63 хлопчика – 54,31 % і 53 дівчинки – 45,69 %), з визначенням методом полімеразно-ланцюгової реакції поліморфізмів генів *CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*1, CYP2C19*2, CYP3A4*1A, CYP3A4*1B*, які відповідають за біотрансформацію основних ПЕП. Генетичне тестування виконано в лабораторії «Diogen» (м. Київ)

Проаналізовані особливості перебігу ФРЕ у 30 дітей при їх довготривалому спостереженню в залежності від індивідуальних особливостей отриманих в результаті проведеного генотипування.

Для статистичного опрацювання результатів використано пакет програм Statistica-7, з визначенням середньої величини, стандартного відхилення, t-критерію Стьюдента, критерію χ^2 Пірсона. Критичний рівень значущості приймали за 5 %.

У **розділі 3** «Результати експериментального дослідження» детально аналізується ефективність найбільш вживаних для лікування епілепсії ПЕП. Показано, що вона суттєво відрізнялася в групах порівняння, що в період електростимумяції приймали індуктор (карбамазепін) – група «Карбамазепін», інгібіор (сультіам) – група «Сультіам» або плацебо – група «Контроль».

Встановлено, що попереднє призначення сультіаму суттєво підвищувало притисудомний ефект від введення ПЕП в порядку зменшення: сультіам > ламотриджин > вальпроат натрію. Спостерігали ефект, залежний від дози, на введення > карбамазепін > леветирацетам в більш високих дозах 60 та 120 мг/кг.

Результати експериментально обґрунтовують, що при лікуванні ФРЕ, підборі ПЕП необхідно враховувати взаємодію препаратів, їх можливий вплив на активність ферментів печінки CYP450.

В кінці 3 розділу автор підсумовує отримані результати з точки зору можливого їх застосування в клінічній практиці.

У **розділі 4** «Загальна характеристика досліджуваних пацієнтів з фармакорезистентною епілепсією» наведено аналіз клініко-анамнестичних даних (вік дебюту нападів; тривалість захворювання; терапія епілепсії, яка використовувалась раніше). Дисертант наводить особливості ФРЕ у обстежених дітей за формами епілепсії та характером нападів, схильністю до серійних нападів та статусному перебігу, виникнення побічних ефектів та їх особливості.

Отримані результати співпадають з літературними даними, що чинниками, які можуть свідчити про можливість виникнення фармакорезистентності є: ранній дебют – у проведеному дослідженні у 50,86% до 3-х років, і майже у третини дітей до 1-го року (29,93 %); симптоматичні форми захворювання – у

94,83 % дітей; перевага фокальних (22,4%) та фокальних з вторинною генералізацією (62,9%) типів нападів. Незважаючи на використаний майже весь арсенал існуючих ПЕП, велику кількість спроб заміни терапії, трохи більше ніж у третини випадків (31,90%), їх було від 5 до 10, повторення епілептичних нападів не вдалося подолати.

Важливим в роботі є аналіз фармакогенетичного тестування, з визначенням поліморфізмів генів системи цитохрому Р450, у дітей з ФРЕ. Таке дослідження виконано вперше в Україні, існують тільки поодинокі подібні в світі. Воно виявило велику їх поширеність - у 75 пацієнтів (64,56 %):

- найчастіше виявлявся поліморфізм гену *CYP2C19* (48 пацієнтів – 41,38 %);
- у 12,07 % пацієнтів встановлено наявність комбінацій поліморфізмів різних генів.

Провівши ретельний порівняльний аналіз стосовно розповсюдженості алельних варіантів в загальній українській та популяціях інших країн показав, що частота поліморфізмів *CYP3A4*1B* та CYP2C19*2 у обстежених нами пацієнтів є достовірно вищою, ніж в загальній українській популяції.

Серед дітей з ФРЕ поліморфізми гену *CYP2C19* достовірно частіше зафіксовані в нашому дослідженні в порівнянні з відповідними показниками, отриманими в Росії та Туреччині.

В кінці розділу автор підсумовує отримані результати, наводить роботи, в яких вони були висвітлені.

В **5 розділі** дисертації «Варіанти перебігу в залежності від генетичних особливостей та індивідуалізація лікувальних програм для дітей з фармакорезистентною епілепсією» наводяться результати довготривалого спостереження, щонайменше 5 років, 30 дітей. Проведене співставлення в залежності від наявності або відсутності у них поліморфізмів генів системи цитохрому Р450, які беруть участь у метаболізмі ПЕП. Детальний аналіз виявив

певні закономірності, які стосуються етіологічнх та прогностичних чинників перебігу.

Так, у дітей з поліморфізмами достовірно частіше визначається хвилеподібний перебіг захворювання (54,55±10,87% проти 12,50±12,50%, $p<0,05$). Характерною особливістю хвилеподібного перебігу медикаментозно-резистентної епілепсії була наявність своєрідного феномену «зісковзування»: при призначенні іншого ПЕП спочатку отримувався позитивний ефект, який через деякий час нівелювався, незважаючи на подальше збільшення дози, без впливу будь-яких екзо- або ендогенних провокуючих факторів.

Отримані результати дозволяють наперед прогнозувати перебіг медикаментозно-резистентної епілепсії у кожної окремої дитини, а подальше вивчення генетичних особливостей пацієнтів дозволить більш широко застосовувати індивідуалізовані підходи до терапії, запобігати виникненню небажаних побічних ефектів та витрат на лікування, покращити якість життя пацієнтів з ФРЕ та їх родин.

Основний зміст одержаних результатів відображено у 6 **висновках** які сформульовані вдало, є чіткими, логічними, аргументованими, відповідають завданням, базуються на достовірному матеріалі та свідчать про досягнення поставленої мети. Список використаних джерел наукової літератури оформлений відповідно до існуючих вимог до оформлення дисертації Міністерства освіти і науки України з використанням APA style (American Psychological Association, 2023) та містить 218 джерел, з яких 202 викладено латиницею, 16 – кирилицею.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці.

Результати дослідження можуть слугувати базою для розробки нових клінічних протоколів щодо лікувальної тактики за хворими з фармакорезистентною епілепсією, резервом поліпшення персоніфікованої терапії цієї патології.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Принципових зауважень до змісту і оформлення дисертації немає.

Однак в тексті окремих розділів дисертації є повтори, стилістичні та граматичні помилки.

1. В анотації слід правильно вказувати назву ВНЗ, де проводились дослідження (с.2) – Одеський НАЦІОНАЛЬНИЙ медичний університет.
2. В анотації (с.3) не наводяться посилання на літературні джерела, а також скорочення, які не мають розшифровки (напр., ЄС).
3. В розділі 2.1. автор зазначає, що «Дослідження проведено на 60 безпородних білих мишах-самцях масою 17-20 г лінії BALB/c…», тоді як насправді це інбредні миші чистої лінії.
4. Методи дослідження автором вказані неточно: моделювання патологічного процесу, його лікування – це використання патофізіологічних, фармакологічних методів, аналіз історій хвороб – ретроспективний клінічний метод і т.п.
5. Розділ «Обговорення результатів дослідження» є занадто лаконічним, недостатньо висвітлена експериментальна частина роботи.

Під час захисту дисертації в плані дискусії бажано отримати відповіді дисертанта на **такі питання:**

1. Карбамазепін та сультіам обрані Вами як індуктори/інгібітори ферментів. На які саме ізоформи CYP 450 вони впливають? Чи вони є плейотропними?

2. Чому, на Вашу думку, модуляція активності різних ізоформ цитохрому Р450 змінювала клінічну ефективність препаратів, метаболізм яких не пов'язаний із участю CYP 450 (напр., ламотриджину). Яку роль відіграє Р-глікопротеїн в цьому процесі?

3. На Вашу думку, або з літературних даних, біотрансформація ПЕП, які були використані в роботі, приводить до появи фармакологічно активних метаболітів? Чи може це стати однією з причин отриманих Вами результатів?

4. Чи відомо Вам, які ще групи лікарських препаратів метаболізуються ізоферментами CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4? Чи є у Вас дані власних або літературних спостережень щодо модуляції фармакологічної активності та токсичності препаратів цих груп на тлі введення індукторів або інгібіторів відповідних цитохромів?

Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності

Принципи академічної доброчесності при виконанні дисертаційного дослідження та написанні роботи були дотримані автором у повній мірі. За результатами перевірки дисертації на плагіат програмним засобом «*Anti-Plagiarism v-15.257*», рівень оригінальності становить 100 %. Тобто, можна вважати, що робота виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (компіляції). Усі запозичення з друкованих та електронних джерел, а також із захищених раніше науково-дослідних робіт, кандидатських і докторських дисертацій мають відповідні посилання та цитування, оформлені у відповідності до діючих правил.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

З усього вищевикладеного можна зробити висновок про те, що дисертаційна робота «Експериментальне дослідження ефективності протиепілептичних препаратів у лікуванні судом у мишей з корнеальним кіндлінгом на тлі потенційної модуляції ферментів системи цитохрому Р450» є закінченою науковою працею, в якій досягнута основна мета та вирішені задачі дослідження, і відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії,

затвердженого постановою КМУ від 12 січня 2022 року № 44, а її автор, Танцура Євген Олександрович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Завідувачка кафедри фармакології
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова,
доктор медичних наук, професор Наталія ВОЛОЩУК