

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію Павлюка Івана Володимировича «Нейропротективна дія похідних L-лізину при хронічному алкоголізмі», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

### Актуальність теми

Актуальність теми дисертації обумовлена значним зловживанням алкоголем серед різних соціальних груп населення, що призводить до збільшенню захворюваності населення (алкогольний цироз печінки, порушення функції ШКТ, серцево-судинні, нервові розлади та ін.), інвалідизації, летальності, а також значних економічних втрат. Показано, що на алкоголізм страждає до 5% населення промислово-розвинутих країн. Для України та країн СНД, ця цифра коливається за різними оцінками від 10 до 20%. В останні роки збільшуються процент жіночого алкоголізму. Окреме місце займають ураження ЦНС, що супроводжуються численими неврологічними, а також психічними порушеннями, пошкодженням периферичних нервів (алкогольна поліневропатія). Відомо, що для етанолу не існує специфічних рецепторів і він розчиняючись в ліпідах мембран клітин, виявляє неспецифічну дію на ЦНС, що виражається в зміні плинності і структури клітинних мембран, активності ліпідзалежних білків (ферментів, рецепторів, G-білків), мембранних іонних струмів і генерації потенціалів. Етанол, проникаючи крізь іонні канали цитоплазматичних мембран за градієнтом концентрації і змінює метаболізм нервових клітин і впливає на функції багатьох нейромедіаторних систем. Збільшується викид катехоламінів в синаптичну щілину, гальмується їх метаболізм, і як наслідок, підвищується рівень дофаміну в неостріатумі і гіпоталамусі і ретикулярної формації середнього мозку. Також підвищується активність аденілатциклази і синтез цАМФ, виникає ейфорія, зникає емоційна напруженість. Одночасно стимулюється вхід  $Cl^-$  в клітку, що стимулює ГАМК-ергічні гальмування. Одночасно підвищується чутливість до глутамату та кількість NMDA-рецепторів, що обумовлює підвищену нервову збудливість.

Відбувається проліферація ділянок зв'язування і потенціал-залежних кальцієвих каналів NMDA-рецепторів. Підвищується вхід в клітку і звільнення з депо  $\text{Ca}^{2+}$ , виникає епілептиформна активність абстинентного синдрому і активація  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних протеаз і фосфоліпаз. Наслідком цього є гіпоксія мозку, ацидоз, пошкодження мембран нейронів, зниження тонуусу мозкових судин. Кровоток в субкортикальних зонах, таламусі і базальних гангліях. У цьому плані актуально, у складі комплексної терапії інтоксикації алкоголем, застосовувати нейропротектори. На сьогоднішній день немає нейропротектору, який би оптимально задовільняв вимогам клініки. Перспективними для пошуку нейропротекторів є L-лізин і його похідні. L-лізин шляхом перетворення в піпеколієву кислоту підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу, знижує трансмітерний аутокоідоз і проявляє властивості ендogenous антиконвульсанта, нейропротектора і анксиолітика. З огляду на вищевикладене, слід підкреслити високу актуальність проведеного дослідження, присвяченого пошуку нового лікарського засобу, що в перспективі може переважати за ефективністю та/чи безпекою існуючі аналоги.

Дисертантом визначено хімічний ряд перспективний для пошуку нових нейропротекторів, моделі для фармакологічного скринінгу та поглибленого вивчення специфічної активності найбільш активної сполуки ((S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін)).

Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP<sub>70</sub>/HIF-1 $\alpha$ -опосередковані механізми ендogenous нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020). Дисертант є співвиконавцем зазначених НДР.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків**

## та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Робота ґрунтується на аналізі експериментальних досліджень присвячених вивченню специфічної активності (нейропотекторна активність) та токсичності сполук L-лізину - L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N<sup>6</sup>-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату, а також поглибленому вивченні фармакологічної активності найбільш активної сполуки, які були проведено на 410 статевозрілих нелінійних білих щурах обох статей. В роботі використані адекватні поставленим задачам методи дослідження: токсикологічні, біохімічні, фармакологічні, імуноферментні, морфологічні, статистичні, вестернблотінг. Основні положення та висновки дисертації аргументовані та обґрунтовані представленими матеріалами.

## Наукова новизна одержаних результатів

В дисертаційній роботі вперше отримані дані про нейропротективну активність сполук L-лізину - L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N<sup>6</sup>-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату на моделі гострої алкогольної інтоксикації; дію даного виду активності направлено на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій, а також на зниження оксидативного стресу і нейроапоптозу. Встановлено, що (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) за величиною нейропротективної дії переверщує досліджувані сполуки L-лізину і референс-препарат Мілдронат. Вперше на моделі хронічної алкогольної інтоксикації виявлена висока нейропротективна активність Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні, показано його перевагу при порівнянні з Мілдронатом. Встановлено, що Ангіолін при його лікувальному і профілактичному режимах введення в умовах хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення щільності ендотеліоцитів судин головного мозку, підвищення експресії ендотеліального фактора росту (VEGF), гальмування оксидативного стресу, підвищення

аеробної продукції АТФ, підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампа, гальмування нейроапоптозу, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2, підвищення РНК в нейронах СА1-гіпокампа і, як наслідок, зменшення неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Отримані результати експериментального дослідження нейропротективної дії (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) увійшли до звіту, який представлений в ДУ «Державний експертний Центр МОЗ України» з метою створення нового лікарського препарату.

Новизна досліджень підтверджена патентами України (№ 106867 від 10.10.2014 та № 111462 від 25.04.2016). Результати дослідження впроваджені в педагогічний процес і наукову роботу Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської державної медичної академії, Буковинської державної медичної академії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»; кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету; кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету; кафедри загальної та медичної фармакології Одеського національного медичного університету, а також до наукового процесу ДП «Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції» МО України.

### **Повнота викладення матеріалів дисертації**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковані 14 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах України, що реферуються міжнародними науково метричними базами даних РИНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, 6 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Дисертантом отримано 2 патенти України на винахід № 106867 від 10.10.2014, № 111462 від 25.04.2016.

## **Характеристика змісту дисертації**

Дисертація побудована традиційно, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, двох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних літературних джерел, а також додатків. Раціонально та логічно до змісту роботи використовуються 37 таблиць та 7 рисунків. Список використаної літератури містить 354 посилань (з них 280 з кириличної графікою, 74 - з латинською). Обсяг рукопису дисертації складає 226 сторінок друкованого тексту.

У вступі до дисертації автором розкрита актуальність питання, що вивчається, дана характеристика об'єкта, предмета, методів дослідження, висвітлена мета та задачі дослідження.

**Мета дослідження** сформульована конкретно і передбачає скринінг похідних L-лізину у якості нейропротекторів в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації, виділення найбільш активної сполуки та поглиблене вивчення механізмів терапевтичної активності. Для досягнення поставленої мети автором на підставі якісного проведення аналізу літератури з висвітленням невирішених питань сформульовані конкретні задачі. Наведені наукова новизна, практична цінність роботи, впровадження результатів дослідження в практику, особистий внесок автора, апробація результатів дослідження та публікації.

Огляд літератури викладено логічно і послідовно. У ньому висвітлені епідеміологія отруєнь алкоголем, патогенезу нейротоксичної дії алкоголю (вплив на процеси ПОЛ, зміни в експресії відповідних генів, апоптозу та ін.), препарати та схеми терапії алкогольних отруєнь, їх переваги і недоліки, перспективні мішені для фармакологічного впливу.

З огляду літератури закономірно та органічно впливає перспективність впливу на модуляцію синтезу NO і утилізацію його токсичних продуктів біотрансформації у якості мішені для терапії алкогольної інтоксикації.

У розділі II викладені матеріали та методи дослідження, дана загальна характеристика об'єкту та предметів дослідження, надана характеристика лабораторних тварин, залучених до експериментальних досліджень та характеристика лікарських засобів, які використані в роботі, описані методи дослідження, надана структура експериментального дослідження, описані експериментальні моделі, токсикологічні, фармакологічні, біохімічні, статистичні та інші методи дослідження. Слід зауважити, що обрані експериментальні моделі та використані методи є адекватними і правильними для всебічного розкриття поставленої мети та задач дослідження, а загальна кількість об'єктів спостереження дозволяє зробити повноцінний статистичний аналіз отриманих результатів.

У розділі III наведено власні експериментальні дані, а саме порівняльне вивчення нейропоротекторної активності L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, (S)-2,6 діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетата (Ангіолін) і N-6-(1-іміноетил)-L-лізину дигідрохлориду при моделюванні гострої алкогольної інтоксикації, виділено найбільш активну сполуку та поглиблено вивчено її ефективність при профілактичному та терапевтичному застосуванні, розраховано ЕД<sub>50</sub>, вивчена гостра токсичність.

Розділ IV містить результати, щодо нейропротективної і ендотеліопротективної дії таблеток «Ангіолін» при хронічній алкогольній інтоксикації під час лікувального і профілактичного режиму введення. Показано зменшення показників оксидативного і нітрозативного стресу, зниження розвитку неврологічного та когнітивного дефіциту у тварин, а також зменшення ступеню враженості енергодефіциту. Нейропротективна дія Ангіоліну підтвердилася і при морфологічних дослідженнях нейронів зони СА-1 гіпокампу тварин, які перенесли хронічну алкогольну інтоксикацію.

Розділ V містить аналіз та узагальнення отриманих результатів. Автором проведена систематизація виконаної роботи та визначення найбільш суттєвих результатів дослідження.

Загальні висновки логічно витікають зі змісту дисертації, повністю відповідають поставленим меті та задачам дослідження, точно відображають результати експериментальних досліджень та мають послідовне і логічне викладення.

### **Недоліки дисертації щодо її змісту та оформлення.**

Принципових зауважень щодо оформлення дисертації немає. З зауважень до змісту слід відзначити наступні:

1. У тексті дисертації зустрічаються граматичні та стилістичні помилки;
2. Мало літературних джерел на латиниці 74 з 354;
3. У літературному огляді, потенцюється проблема алкоголізму на пострадянському просторі, хоча це проблема значно ширше (фактично всі країни світу); класифікації нозології, що вивчається згідно Міжнародної класифікації хвороб (МКБ-10), та загальні дискусійні питання, краще давати на початку літературного огляду; зробити акцент на недоліки препаратів.
4. У розділі «Матеріал та методи досліджень» дуже детально описано методи досліджень. Деякі фрагменти опису методик більш раціонально містилися б у розділах експериментальних досліджень, плані дискусії отриманих результатів.

Під час офіційного захисту, пропоную обговорити наступні питання та прошу автора відповісти на такі питання:

1. Чому у якості препарату порівняння обрано мельдоній?
2. Артеріальна гіпертензія - одне з найпоширеніших патологій серцево-судинної системи у хворих ХАІ. На скільки застосування Ангіоліну може бути безпечним у плані розвитку небажаних ефектів зі сторони ССС (гостра серцева недостатність, напад стенокардії, інфаркт міокарду та ін.) у зв'язку з модуляцією стану системи NO?
3. При яких стадіях алкогольної хвороби і в яких схемах терапії (як головний чи допоміжний препарат) планується застосування Ангіоліну?

## Висновок

Дисертаційна робота Павлюка Івана Володимировича «Нейропротективна дія похідних L-лізину при хронічному алкоголізмі» є завершеною, самостійно виконаною кваліфікаційною науковою роботою, яка присвячена пошуку нових нейропротекторних засобів в ряду похідних L-лізину, та вивченню активності ряду на прикладі більш ефективної сполуки. Слід зазначити, що на базі найбільш активної сполуки створюється новий нейропротекторний препарат.

Зроблені зауваження не мають принципового характеру та не зменшують цінність роботи.

Дисертаційна робота Павлюка Івана Володимировича «Нейропротективна дія похідних L-лізину при хронічному алкоголізмі» повністю відповідає чинним вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., а дисертант заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія.

Офіційний опонент:

Доцент кафедри фармакології  
Національного медичного університету  
ім. О.О. Богомольці,  
доктор біологічних наук

  
О.Є. Ядловський  
18