

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Чорної Наталії Степанівни «Фармакологічне обґрунтування застосування густого екстракту з листя берези бородавчастої (Betula verrucosa Ehrh.) для лікування діабетичної нефропатії», 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 обраної теми дисертації

Цукровий діабет вважається неінфекційною епідемією двадцять першого століття через значну розповсюдженість. Головними ускладненнями цукрового діабету є макро- та мікроангіопатії. Одним із мікроангіопатичних ускладнень є діабетична нефропатія, яка може розвинути у 30-40% хворих цукровим діабетом. Діабетична нефропатія є однією з основних причин хронічної хвороби нирок у пацієнтів та найчастіше призводить до термінальних стадій ниркової недостатності. Питання перебігу діабетичної нефропатії, ранньої діагностики її ускладнень та оптимізації лікування залишаються актуальними та потребують подальшого дослідження. Для запобігання розвитку діабетичної нефропатії, крім гіпоглікемічної терапії, застосовують синтетичні лікарські засоби іАПФ та БРА. В останній час рекомендують використовувати статини, які крім гіполіпідемічної дії, чинять виразний протизапальний ефект. В термінальні стадії хронічної ниркової недостатності застосовують гіпоазотемічні засоби.

Нажаль, терапія вищенаведеними лікарськими засобами є недостатньою. Публікації останніх років свідчать про активний пошук лікарських засобів з нефропротекторними властивостями. Одним з таких засобів є «Канефрон[®]Н», виробництва фірми «Біонорика SE», який в клінічних дослідженнях показав ефективність лікування діабетичної нефропатії. Подібні засоби українського виробництва відсутні. Аналіз

літературних джерел вказує, що мультифакторні властивості рослинних поліфенолів, зокрема флавоноїдів, дають підставу для пошуку засобів для лікування діабетичної нефропатії.

У зв'язку з вищевикладеним, перспективним для вивчення є густий екстракт з листя берези бородавчастої з високим вмістом гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та дубильних речовин. В народній медицині листя берези використовували як цукрознижувальний та діуретичний засіб. Чисельні наукові дослідження підтвердили діуретичну та гіпоглікемічну дію листя берези, а також зниження під його дією інсулінорезистентності. Усе вищезазначене теоретично обґрунтовує доцільність та актуальність пошуку нового нефропротектора для комплексного лікування діабетичної нефропатії, цьому і присвячена дисертаційна робота Чорної Н.С.

Зв'язок теми дисертації з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційну роботу виконано у межах науково-дослідних програм Національного фармацевтичного університету: „Фармакологічні дослідження біологічно-активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці”, № держ. реєстрації 0103U000478 та „Фармакологічне вивчення біологічно-активних речовин та лікарських засобів”, № держ. реєстрації 0114 U000956, в яких автор є співвиконавцем.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертант уперше на моделях порушення вуглеводного обміну встановив ефективність густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛІББ) в запобіганні розвитку діабетичної нефропатії, та визначено його здатність до відновлення порушених вуглеводного, білкового, ліпідного обмінів, гемостазу, до зменшення проявів системного запалення, що сприяє покращенню функції нирок та уповільненню патологічних змін їх структури.

Доповнено наукові дані про фармакологічні властивості (гіпоазотемічн, протизапальна, антиоксидантна дія, здатність збільшувати спонтанний діурез

та зменшувати екскрецію белка) продуктів з рослинної сировини берези, що обумовлюють нефропротекторну дію на тлі цукрового діабету і метаболічного синдрому. Отримано нові наукові дані щодо ефективності ГЕЛББ для запобігання розвитку діабетичної нефропатії. Так, під впливом ГЕЛББ на тлі алоксан-індукованого цукрового діабету зменшується рівень гіперглікемії у щурів на 25 %, глюкозурії на 35%, спостерігається відновлення системи згортання крові, зменшуються катаболічні процеси. Густий екстракт з листя берези бородавчастої сприяє збереженню електролітів, зменшуючи екскрецію натрію, калію, кальцію та хлоридів майже в 3 рази. Нефропротекторна дія ГЕЛББ позначається на зниженні коефіцієнту маси нирок на 15%, та підтверджується морфологічними дослідженнями, які ілюструють зменшення проявів гіалінізації клубочків та зменшення відкладення глікогену в каналцях. На тлі експериментального метаболічного синдрому ГЕЛББ зменшує інсулінорезистентність (коефіцієнт чутливості до інсуліну зростає на 40%), концентрацію в крові тригліцеридів на 29% і ліпопротеїди низької щільності на 12%, зменшує системне запалення, про що свідчить зниження ШОЕ в 2,3 разу і зниження кількості лейкоцитів на 22%, що сприяє збереженню структури нирок.

Дослідження гострої токсичності на щурах самцях свідчить, що ЛД₅₀ ГЕЛББ лежить за межами дози 5000 мг/кг, що дозволяє класифікувати його як „практично нетоксичну речовину” відповідно до загальноприйнятої класифікації, та вказує на його нешкідливість.

Значущість праці для науки та практики. Результати дисертаційної роботи є фрагментом доклінічного вивчення ГЕЛББ, та виступають експериментальним обґрунтуванням доцільності створення на його основі лікарського засобу нефропротекторної дії для оптимізації лікування діабетичної нефропатії.

Запропоновано спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя берези (патент України на винахід № 95690 від 25.08.2011 р).

Результати дисертаційної роботи щодо фармакологічної активності ГЕЛББ впроваджені у науковий та науково-педагогічний процес кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ „Дніпропетровська медична академія МОЗ України” (протокол № 5 від 07.10.2016 р.), кафедри експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією ВДНЗУ „Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 7 від 10.11.2016 р.), у науковій роботі ДП „Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції” (протокол № 3 від 30.11.2016 р.) та ЦНДЛ Національного фармацевтичного університету (протокол № 11 від 18.11.2016 р.).

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

Обґрунтованість наукових положень і висновків дисертації ґрунтується на достатньо великому обсязі експериментальних результатів, їх всебічному аналізі

Фармакологічні дослідження проведені на базі ЦНДЛ НФаУ, яка атестована МОЗ України (посвідчення №058/15 від 08.12.2015 р., чинне до 07.12.2019 р.) і виконані на 276 білих безпородних щурах і 32 білих безпородних мишах, які вирощені у віварії ЦНДЛ. В роботі використані дві моделі вуглеводних порушень – цукрового діабету 1 типу і метаболічного синдрому, при яких розвивається діабетична нефропатія, яка супроводжується специфічними морфологічними змінами в нирках та патологічними змінами їх функцій.

Нефропротекторну дію досліджуваного густого екстракту з листя берези бородавчастої на тлі діабетичної нефропатії оцінювали за достатньо інформативними показниками: гіперглікемією, поліурією, глюкозурією, протеїнурією, обміном натрію, калію, кальцію та хлоридів, змінами в гемостазі та в морфологічній будові нирок. При виконанні дисертаційної роботи були використані фармакологічні, біохімічні, гістологічні і методи

математичної статистики. Усього використано 10 експериментальних моделей і 30 методів дослідження.

Фактичний матеріал достатньо повно ілюстрований таблицями та рисунками. Всі теоретичні узагальнення та висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і повністю відображають закономірності, які були виявлені в ході проведених досліджень. На підставі цього вважаю, що наукові положення та висновки даної дисертації є цілком обґрунтованими, узгодженими з метою та задачами дослідженнями.

Матеріал дисертаційної роботи викладений логічно та послідовно, характеризується узгодженістю викладених результатів.

Достовірність отриманих у роботі результатів не викликає сумнівів, оскільки базується на сучасних інформативних методах досліджень, коректним обробленням отриманих значень із залученням сучасного програмного забезпечення.

Основний зміст дисертації та його оцінка

Загальні відомості про роботу. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, розділу „Аналіз та узагальнення результатів”, загальних висновків, списку використаних джерел літератури. Загальний обсяг дисертації складає 186 стор., 32 таблиці і 41 рисунок. Бібліографія включає 214 посилань на наукові праці, з них 106 - кирилицею, 108 - латиною.

У вступі обґрунтована актуальність теми роботи, сформульовані мета та завдання дослідження, вказано наукову новизну, розкрито практичне значення отриманих результатів, та показаний особистий внесок здобувача, публікації та де знайдена апробація результатів дисертації.

В огляді літератури проаналізовано сучасне уявлення про розвиток діабетичної нефропатії на тлі вуглеводних порушень, таких як цукровий діабет 1 та 2 типу і метаболічний синдром. Наведено засоби, здатні уповільнювати розвиток діабетичної нефропатії, та розглянуті перспективи рослинних нефропротекторів, зокрема з високим вмістом флавоноїдів,

чинити позитивний вплив на нирки за умов вуглеводних порушень. Досліджені літературні джерела щодо фармакодинаміки продуктів, отриманих з листя берези бородавчастої. У цілому, огляд літератури написаний кваліфіковано.

В розділі «Матеріали та методи» містяться дані про густий екстракт вилучений з листя берези бородавчастої за допомогою багаторазової екстракції 70% етиловим спиртом з подальшим упарюванням та висушуванням у вакуумі до видалення залишків екстрагенту. Густий екстракт з листя берези бородавчастої стандартизований за кількісним вмістом гідроксикоричних кислот (не менше 3,5%), і флавоноїдів (не менше 4,5%). У своїх дослідженнях автор використав широкий арсенал фармакологічних, біохімічних, токсикологічних, гематологічних, гістологічних та методів математичної статистики, що забезпечують комплексність оцінки нефропротекторної дії та безпеки досліджуваного екстракту. Широкий перелік сучасних методів дослідження, обґрунтована постановка експериментів дозволяє зробити висновок про цілеспрямований підхід дисертанта до вирішення поставлених у роботі завдань і дозволяє високо оцінити методичну частину дисертації.

Третій розділ присвячений фармакологічному скринінгу за гіпоазотемічною дією та вивченню нефропротекторної, діуретичної, протизапальної та антиоксидантної дії.

За результатами досліджень показано, що ГЕЛББ виявляє виразну гіпоазотемічну дію на моделі ушкодження нирок хроматом калію в дозі 7 мг/кг. В подальших дослідженнях використовували саме цю дозу. Про нефропротекторну активність густого екстракту з листя берези бородавчастої на цій моделі вказує зменшення коефіцієнту маси нирок та відновлення їх структури.

Густий екстракт з листя берези бородавчастої не впливав на діурез при одноразовому введенні як при спонтанному діурезі так і при навантаженні водою. За умов курсового введення ГЕЛББ та препарат порівняння

збільшували діурез та зменшували екскрецію білка у здорових тварин. На відміну від препарату порівняння, ГЕЛББ чинив виразну протизапальну дію, впливаючи на фазу альтерації та ексудації. На фазу проліферації ГЕЛББ та «Канефрон[®]Н» не впливали.

На моделі ураження нирок тетрахлорметаном спостерігали виразну антиоксидантну активність ГЕЛББ та препарату порівняння драже «Канефрон[®]Н», що позитивно вплинуло на функцію нирок, відновлюючи діурез, швидкість клубочкової фільтрації, а також збільшуючи екскрецію калію. Вивчення параметрів гострої токсичності ГЕЛББ показало, що він відноситься до практично нетоксичних речовин.

Четвертий розділ дисертації присвячений поглибленому вивченню впливу ГЕЛББ на розвиток діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету, викликаного алоксаном тривалістю 1 і 3 місяці.

Показано, що ураження нирок при цукровому діабеті відбувається поступово. Через 1 місяць значущих змін у функції нирок не спостерігали, але в сироватці крові відбулося накопичення креатиніну, сечовини, іонів натрію. Коефіцієнт маси нирок збільшився. Морфологічні дослідження показали вузликову гіалінізацію гломерулярних петель окремих клубочків. Густий екстракт з листя берези бородавчастої вірогідно зменшував в крові концентрацію вищезгаданих показників, коефіцієнт маси нирок вірогідно зменшувався, гіалінізація гломерулярних петель спостерігалася рідше.

Розвиток ЦД протягом 3 місяців позначився на відсутності приросту маси тіла щурів. Тривала гіперглікемія впливала на функцію нирок, призводячи до поліурії, глюкозурії, протеїнурії. Екскреція електролітів, таких як натрій, калій, кальцій та хлориди зростала майже в три рази. Реабсорбція натрію зменшувалася. В сироватці крові на тлі нормального рівня креатиніну спостерігали підвищення рівня сечовини, що вказує на підвищений катаболізм білка. Підвищена екскреція електролітів позначилася на вірогідному зниженні в сироватці кальцію та хлоридів. Коефіцієнт маси нирок зростав вдвічі, дослідження морфоструктури нирок показало

відкладення глікогену в епітелії каналців та в багатьох випадках суцільну гіалінізацію клубочків. Тривала гіперглікемія призводила до зростання концентрації фібриногену в крові та зменшення часу згортання крові, натомість значно уповільнювався час лізису еуглобулінових згустків, що свідчить про порушення фібринолізу. Підвищення концентрації фібриногену в крові та зростання швидкості осідання еритроцитів свідчить про системний запальний процес. Лейкоцитарна формула при цьому зазнає змін, підвищується відсоток нейтрофілів та знижується відсоток лімфоцитів. Густий екстракт з листя берези знижує у щурів гіперглікемію, при цьому знижується поліурія, глюкозурія, протеїнурія. Значно зменшується екскреція іонів натрію, калію, кальцію та хлоридів. Реабсорбція натрію збільшується майже до норми. В крові спостерігали зменшення рівня сечовини, та деяке збільшення концентрації кальцію і хлоридів. Коефіцієнт маси нирок зменшується, гістологічні дослідження нирки свідчать про зменшення відкладення глікогену в епітелії каналців і покращення стану клубочків. Час згортання при цьому збільшується на тлі зменшення концентрації фібриногену, а час лізису еуглобулінових згустків зменшується. В лейкоцитарній формулі відсоток нейтрофілів і лімфоцитів був ближчий до норми. Драже «Канефрон[®]Н» також позитивно впливав на масу тварин, на деякі окремі показники розвитку ЦД та ДН, але значно поступався за активністю ГЕЛББ.

П'ятий розділ дисертації автор присвятив результатам дослідження впливу ГЕЛББ на розвиток діабетичної нефропатії на тлі метаболічного синдрому. У щурів, які замість води тривалий час отримували фруктозу спостерігали характерні ознаки розвитку метаболічного синдрому: збільшення маси тіла, гіперліпідемію, зменшення коефіцієнту чутливості до інсуліну; порушення функції нирок супроводжувалося зменшенням екскреції натрію, та збільшенням його реабсорбції. Морфологічні зміни нирок характерні для початкових стадій розвитку діабетичної нефропатії – збільшення клубочків у розмірах. На тлі ГЕЛББ зростання маси тіла було

повільнішим, зменшувалися рівень ліпопротеїдів низької щільності та тригліцеридів. Коефіцієнт чутливості до інсуліну значно зростав. Але при цьому ГЕЛББ не впливав позитивно на функцію нирок: екскреція та реабсорбція залишилися на рівні патології. Дослідження морфологічної будови нирок показало, що гіпертрофованих клубочків в нирках менше, ніж в патології. При цьому протромбіновий час зростав, час лізису еуглобулінов збільшувався, швидкість осідання еритроцитів та кількість лейкоцитів були близькими до норми. Драже «Канефрон[®]Н» також позитивно впливав на масу тварин, зменшення інсулінорезистентності та гіперліпідемії, урівноважував показники згортання та фібринолізу, позитивно впливали на системне запалення, але не впливали на реабсорбцію та екскрецію натрію у щурів.

У заключному розділі «Аналіз та узагальнення результатів» автор викладає уявлення про стратегію комплексу досліджень, а також науково-практичну сутність результатів роботи, що засвідчує ерудицію автора з даного наукового питання, представляє логіку усього дослідження. Матеріали даного розділу представлені на професійному рівні, дисертант достатньо вміло узагальнює результати власних досліджень з залученням інформації з літературних джерел. Порівняльний аналіз фармакологічних ефектів густого екстракту з листя берези бородавчастої та драже «Канефрон[®]Н» вказує на перевагу першого, що вказує на перспективність отриманих результатів.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях.

Наукові положення, висновки та практичні рекомендації викладені в опублікованих працях і виходять із результатів досліджень, викладених у розділах дисертації. За матеріалами дисертації надруковано 17 робіт: 9 статей, з них 6 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 закордонна стаття, 7 тез доповідей та 1 патент на винахід.

Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації.

Оформлення дисертації та автореферат Чорної Н.С. відповідає вимогам МОН України щодо викладення, об'єму, структури, графічного матеріалу, ілюстрацій, посилань на джерела літератури. Зміст автореферату відповідає результатам, викладеним у дисертації і повністю висвітлює усі її положення та висновки.

Зауваження щодо змісту дисертації.

1. Аббревіатуру «ХХН» слід вважати скороченням словосполучення «хронічна хвороба нирок» (згідно медико-технологічній документації), а не «хронічне захворювання нирок».
2. Таблиці оформлені не однотипово, що перешкоджає ознайомленню з їх змістом. Так, назви експериментальних груп і досліджувані показники зустрічаються в заголовках рядків і заголовках граф. Бажано, щоб таблиці розташовувалися після згадки їх в тексті.
3. У розділах, що стосуються опису експериментальних даних (2-5 розділ), 40% (36 сторінок) присвячено результатам морфологічних досліджень. Незважаючи на важливість таких досліджень, їх виконання вимагає спеціальної професійної підготовки, а значить зменшує роль автора в проведенні досліджень.
4. У підписах до фотографій мікропрепаратів повинен бути зазначений об'єкт - препарат нирки, а не власне нирка.
5. При вивченні протизапальної активності на моделі зімозанового набряку не використано препарат порівняння за механізмом відповідної дії.
6. Зустрічаються граматичні та стилістичні помилки (стор.34, 38, 39, 48, 58, 68, 71, 83, 91, 94, 103, 133).

Наведені зауваження принципово не змінюють оцінку дисертаційної роботи. У порядку наукової дискусії хотілося б послухати судження дисертанта з таких питань:

1. Прокоментуйте зміни показників ПОЛ / АОС під впливом ГЕЛББ в умовах тетрахлорметанового пошкодження нирок. Зокрема, чому на тлі зниження концентрації продуктів ПОЛ також зменшується активність каталази (в 1,5 разів у порівнянні з негативним контролем і в 1,8 разів у порівнянні з позитивним контролем)?

2. Яка на Ваш погляд роль діючих компонентів екстракту (його біологічно активних речовин) в зниженні інсулінорезистентності та впливі на процеси реабсорбції і фільтрації в нирках?

3. З якою метою в ході обробки даних Ви використали різні статистичні критерії і чому отримані результати наведені в таблицях в одному випадку як середнє арифметичне та стандартна помилка ($M \pm m$), а в інших як медіана та верхній і нижній процентілі (Me (LQ; UQ))?

Рекомендації щодо використання результатів дисертації в практиці

Матеріали даного дослідження можуть бути вагомим обґрунтуванням перспективності подальшої розробки лікарського засобу, призначеного для комплексної терапії та уповільнення розвитку діабетичної нефропатії.

Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Чорної Н.С. на тему «Фармакологічне обґрунтування застосування густого екстракту з листя берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) для лікування діабетичної нефропатії» є завершеною науково-дослідною працею, у якій наведене теоретичне та експериментальне вирішення наукової задачі фармакології, яка полягає у пошуку нових потенційних нефропротекторів серед рослинних екстрактів з листя берези бородавчастої для уповільнення розвитку діабетичної нефропатії. Вона відповідає вимогам МОН України за новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, а також технічним оформленням роботи.

Висновок

За актуальністю, новизною, практичним значенням та загальним науковим рівнем робота повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ від 24.07.2013 р. №567 (із змінами), які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор, Чорна Наталія Степанівна, а дисертант заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент

Завідувач кафедри загальної та клінічної фармації ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», доктор фармацевтичних наук, професор

