

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ЧОРНА НАТАЛІЯ СТЕПАНІВНА

УДК:615.322:616.379-008.64:616.61:001.891.5

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ
ГУСТОГО ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ БЕРЕЗИ БОРОДАВЧАСТОЇ
(*BETULA VERRUCOSA* EHRL.)
ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакоелекономіки Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України,
ЯКОВЛЄВА Лариса Василівна,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри фармакоелекономіки

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор,
ПОДПЛЕТНЯ Олена Анатоліївна,
ДЗ „Дніпропетровська медична академія
МОЗ України”,
завідувач кафедри загальної та клінічної фармації

доктор фармацевтичних наук, професор,
ЄРМОЛЕНКО Тамара Іванівна,
Харківський національний медичний
університет МОЗ України,
завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури

Захист відбудеться “ 19 ” січня 2017 року о 12 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий “ 15 ” грудня 2016 р.

Учений секретар спеціалізованої
вченої ради, д.фарм.н., проф. _____

Т.С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Основним ускладненням цукрового діабету (ЦД) є діабетична нефропатія (ДН) (Д.М.Хакимова и соавт., 2011). Важливо, що діагностика ДН на ранніх стадіях її розвитку значно ускладнена, а наявність протеїнурії свідчить про важковиліковне, навіть в умовах задовільної компенсації хвороби, незворотне ураження нирок. Зазначений невтішний прогноз обумовлений морфологічними змінами, такими як глікогенна інфільтрація епітелію і каналців, та розвиток інтракапілярного гломерулосклерозу (В.Л.Шевелева и соавт., 2009).

В ініціації і прогресуванні нефросклерозу приймає участь велика кількість механізмів, в тому числі генетична схильність, недостатньо ефективний метаболічний контроль діабету, активація ростових факторів, гіперфільтрація, гіпертензія та ін., які призводять до порушення кровотоку в нирках і протеїнурії (И.И.Топчий, 2005). Серед патогенетичних аспектів у розвитку ДН важливу роль відіграють зміни реологічних властивостей крові (О.В.Граніна, 2009).

Виникнення ДН у хворих на ЦД значною мірою обумовлює прогноз і значно погіршує якість життя та можливість корекції порушень обміну речовин – гіперглікемії, гіперліпідемії, порушень гемодинаміки, нервових, судинних та інших розладів (А.І.Таран, 2007). Прогресування ДН призводить до необоротної втрати функції нирок – хронічної ниркової недостатності (ХНН). Серед основних показників, що свідчать про втрату функції нирок, слід відмітити підвищення рівня креатиніну, сечовини, калію, зниження клубочкової фільтрації (Л.М.Михальчук та співавт., 2009).

Враховуючи, що трансплантацію нирок дозволити собі можуть лише одиниці, більшість хворих з термінальною стадією ХНН приречені на неминучу смерть, відстрочуючи її гемодіалізом, що є дуже вартісним і тимчасовим методом лікування, яке має низку побічних дій. У зв'язку з вищевказаним, попередження розвитку термінальних стадій хронічного захворювання нирок (ХЗН) є дуже важливим і актуальним напрямком наукового пошуку (Е.С.Кузнецова и соавт., 2015). Перспективним джерелом для створення лікарських засобів з нефропротекторними властивостями є поліфенольні сполуки, з яких найбільш чисельну групу складають флавоноїди. Останні мають мультифакторні властивості, які можуть впливати на всі ланки розвитку ДН. Дана дисертаційна робота присвячена фармакологічному вивченню впливу густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ), на розвиток ДН у щурів при експериментальному ЦД 1 типу і метаболічному синдромі (МС).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана за планом науково-дослідних робіт 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, у яких автор є співвиконавцем.

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було експериментальне обґрунтування доцільності використання густого екстракту з листя берези бородавчастої для профілактики та комплексного лікування діабетичної нефропатії.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Дослідити гіпоазотемічну та нефропротекторну активність густого екстракту з листя берези бородавчастої при ураженні нирок хроматом калію. Встановити його ефективну дозу за гіпоазотемічною активністю.

2. Дослідити ренальні ефекти густого екстракту з листя берези бородавчастої у щурів при різних режимах введення.

3. Провести поглиблене вивчення протизапальної дії густого екстракту з листя берези бородавчастої на моделях, які відтворюють фази запальної реакції.

4. Вивчити антиоксидантну дію густого екстракту з листя берези бородавчастої на моделі тетрахлорметанового ураження нирок у щурів.

5. Вивчити показники гострої токсичності густого екстракту з листя берези бородавчастої.

6. Дослідити вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на розвиток діабетичної нефропатії у щурів на тлі цукрового діабету 1 типу, викликаного алоксаном, в динаміці через 1 і 3 місяці.

7. Дослідити вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на розвиток діабетичної нефропатії у щурів за умов розвитку метаболічного синдрому, викликаного фруктозою.

Об'єкт дослідження. Фармакотерапія діабетичної нефропатії.

Предмет дослідження. Нефропротекторна активність густого екстракту з листя берези бородавчастої.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційної роботи були використані фармакологічні, біохімічні, гематологічні, токсикологічні, гістологічні методи дослідження та методи математичної статистики (параметричні, непараметричні методи).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше на моделях порушення вуглеводного обміну встановлена ефективність густого екстракту з листя берези бородавчастої 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 продуктів з рослинної сировини берези, що обумовлюють нефропротекторну дію на тлі ЦД і МС. Про гіпоазотемічну дію ГЕЛББ свідчить зниження на тлі його введення концентрації сечовини на 46% і креатиніну на 37% при ураженні нирок. Протизапальна дія ГЕЛББ найбільш виразна в фазі ексудації, про що свідчить зменшення набряку на 46% і 30% на моделях карагенінового і зимозанового набряку стопи відповідно. Густий екстракт з листя берези бородавчастої при повторному введенні протягом 7 днів щурам збільшує спонтанний діурез на 98%, а також зменшує екскрецію білка на 29%. На антиоксидантну дію ГЕЛББ вказує зниження дієнових кон'югатів на 64% і ТБК-реактивних продуктів на 13% на моделі ураження нирок тетрахлорметаном.

Отримано нові наукові дані щодо ефективності ГЕЛББ для запобігання розвитку діабетичної нефропатії. Доведено, що під впливом ГЕЛББ на тлі алоксан-індукованого ЦД зменшується рівень гіперглікемії у щурів на 25 %, глюкозурії на 35%, спостерігається відновлення системи згортання крові, про що свідчить зростання часу скипання крові на 32%, та системи фібринолізу, яка вказує на зменшення часу лізису еуглобулінових згустків на 54%. Густий екстракт з листя берези бородавчастої зменшує прояви

системного запалення, на що вказує зменшення швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) на 42%, зменшення концентрації фібриногену на 40% і відновлення співвідношення різних видів лейкоцитів. Під впливом ГЕЛББ на тлі ЦД зменшуються катаболічні процеси, про що свідчить зростання маси тварин та зниження в крові концентрації сечовини на 41 % без збільшення її екскреції. Густий екстракт з листя берези бородавчастої сприяє збереженню електролітів, зменшуючи екскрецію натрію, калію, кальцію та хлоридів майже в 3 рази. На збереження фільтраційного апарату нирки вказує зменшення протеїнурії на 39 %. Нефропротекторна дія ГЕЛББ позначається на зниженні коефіцієнту маси нирок (КМН) 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 ЛПНЩ 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.

Поглиблені уявлення про нешкідливість ГЕЛББ. 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.

Практичне значення одержаних результатів. 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.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота виконана на кафедрі фармакоелектрофізіології НФаУ. Разом з науковим керівником визначені мета, задачі, розроблені методичні підходи, відповідно до яких обрано моделі та методи виконання експериментальної частини дисертаційної роботи. Автором особисто опрацьовано дані вітчизняної та закордонної літератури за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проаналізовано результати та оформлено їх у вигляді таблиць, графіків і діаграм, сформульовано висновки дисертації. У наукових працях, опублікованих у співавторстві з науковим керівником, дисертантом наведено результати власних експериментальних досліджень, проведено підготовку наукових праць до публікації.

Дослідження морфологічної будови нирок відбувалося за консультативної допомоги к.біол.н. Лар'яновської Ю.Б., за що автор висловлює щире подяку.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації викладені та обговорені на: IV Національному конгресі „Людина та ліки - Україна” (Київ, 2011); IV Національному з’їзді фармакологів України (Київ, 2011); Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Фармакологія, фізіологія і патологія нирок”, присвяченій пам’яті професора Ю.І.Іванова та професора Б.А.Пахмурного (Чернівці, 2012); III Всеукраїнській науково-практичній конференції „Хімія природних сполук” (Тернопіль, 2012); XXX Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю „Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів” (Харків, 2013); Національному конгресі „Клінічна фармація: 20 років в Україні” (Харків, 2013); I міжнародній науково-практичній конференції „Функціональні харчові продукти – дієтичні добавки – як дієвий засіб різнопланової профілактики захворювань” (Харків, 2013); 5 науково-практичній конференції з міжнародною участю „Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” (Тернопіль, 2013); Науково-практичній конференції з міжнародною участю „Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом” (Пермь, 2013); II Міжнародній науково-практичній internet-конференції „Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин” (Харків, 2016).

Публікації. 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.

Структура та обсяг дисертації. 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. 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. Всі експерименти виконували у повній відповідності до „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Київ, 2001), що узгоджуються з положеннями „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986). Комісією з біоетики НФаУ порушень етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №4 від 20.04.16 р.).

Об’єктом досліджень став густий екстракт з листя берези бородавчастої розроблений у НФаУ під керівництвом проф. В.С. Кисличенко. Густий екстракт вилучений з листя берези бородавчастої (або берези повислої) - *Betula verrucosa* Ehrh. (синонім *Betula pendula* Roth.) 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%)

(О.І.Нещерет, 2005). В дослідженнях ГЕЛББ застосовували у вигляді водної суспензії внутрішньошлунково в дозі 7 мг/кг, яка визначена в скринінгових дослідженнях за гіпоазотемічною активністю. Препарат порівняння за фармакологічною дією: драже „Канефрон[®]Н” (Bionorica SE, Німеччина) – комбінований рослинний препарат, зареєстрований в Україні та дозволений до клінічного застосування (В.Н. Коваленко и соавт., 2013). Дані клінічних досліджень підтверджують необхідність включення препарату „Канефрон[®]Н” в схеми лікування пацієнтів з діабетом і ураженням нирок на стадії мікроальбумінурії (Л.П.Мартинюк та співавт., 2015). В дослідженнях, паралельно з ГЕЛББ, вивчали драже „Канефрон[®]Н” для порівняння виразності дії. Доза для щурів перерахована з добової дози драже для людини за допомогою коефіцієнтів видової стійкості (Ю.П.Рыболовлев и соавт., 1981) і складає 20 мг/кг.

Усі дослідження у вивченні нефропротектора були виконані згідно з методичними рекомендаціями „Доклінічні дослідження лікарських засобів” (О.В.Стефанов, 2001) і „Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень” (С.Ю.Штриголь та співавт., 2009). Результати дослідження порівнювали з негативним контролем (НК), щури, які також отримували відповідний об’єм води, і позитивним контролем (ПК), щури з модельною патологією, які отримували відповідний об’єм води.

На першому етапі досліджень визначали ефективну дозу ГЕЛББ за гіпоазотемічною активністю на моделі ураження нирок хроматом калію (С.Ю.Штриголь та співавт., 2009). Досліджували ГЕЛББ в дозах, 1, 3, 5, 7 і 9 мг/кг. В сироватці крові щурів концентрацію сечовини і креатиніну визначали за допомогою наборів хімреактивів фірми „Філісіт”, Україна. На даній моделі крім гіпоазотемічної дії вивчали вплив ГЕЛББ на КМН, який розраховували у %, як відношення маси органу до маси тіла (О.В.Стефанов, 2001), та на морфологічні зміни у нирках. Здійснювали напівкількісну оцінку уражень клубочків, звивистих і прямих канальців, збиральних трубок, та змін у стромі. Мікропрепарати нирок готували загальноприйнятими методами, зрізи фарбували гематоксиліном та еозином і ставили ШК-реакцію (Г.А.Меркулов, 1969). Перегляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400, мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500.

Визначали вплив одноразового введення ГЕЛББ на діурез при навантаженні водою 5% від маси тіла тварини (В.В.Белявський та співавт., 2010) і на спонтанний добовий діурез (Е.Б.Берхин, 1977). При навантаженні водою об’єм сечі визначали кожної години від початку збору сечі протягом 4 годин, при спонтанному діурезі визначали добовий об’єм сечі. Розраховували відносну величину діурезу (В.В.Белявський та співавт., 2010). При повторному введенні протягом семи днів вивчали вплив ГЕЛББ на функціональний стан нирок при спонтанному добовому діурезі. Визначали величину діурезу вищезгаданим способом. В сечі визначали концентрацію креатиніну за вищезгаданим методом і білка нефелометричним методом за реакцією з сульфосаліциловою кислотою (О.П.Тимошенко та співавт., 2005). В сечі та сироватці крові визначали концентрацію іонів натрію і калію, в сироватці також визначали концентрацію іонів кальцію (Фотометр полум’яний автоматизований ПАЖ-3). В сироватці крові щурів визначали концентрацію сечовини і креатиніну вищезгаданим методом. Розраховували ШКФ, відносну реабсорбцію води та екскрецію креатиніну, білка, іонів натрію і калію (В.В.Белявський та співавт., 2010).

Антиальтеративну активність ГЕЛББ визначали на моделі асептичного запалення шкіри у щурів (О.В.Стефанов, 2001). Густий екстракт з листя берези бородавчастої вводили щоденно з першого дня експерименту та протягом 21 дня. Антиексудативну дію ГЕЛББ вивчали на моделі карагенінового і зимозанового набряків стопи у щурів (О.В.Стефанов, 2001). За розвитком карагенінового набряку спостерігали протягом доби, зимозанового – протягом 3 годин. Про набряк свідчило зростання об'єму стопи в порівнянні з вихідними даними. Аналгетичну дію ГЕЛББ вивчали на моделі оцтовокислих корчів у мишей (О.В.Стефанов, 2001). Як препарат порівняння за антиексудативною дією на моделі карагенінового набряку та за аналгетичною активністю використовували диклофенак натрію („Ортофен-Здоров'я” таблетки 25 мг, виробництва ТОВ „ФК „Здоров'я”, Україна) у дозі 8 мг/кг (О.В.Стефанов, 2001). Вивчення антипроліферативної активності відбувалося на моделі ватної гранульоми (О.В.Стефанов, 2001). Як препарат порівняння використовували піроксикам („Федин-20” капсули 20 мг, виробництва „Synmedic Laboratories”, Індія), який вводили в дозі 12 мг/кг (О.В.Стефанов, 2001). Антипроліферативну активність ГЕЛББ визначали за здатністю пригнічувати утворення грануляційної тканини (О.В.Стефанов, 2001).

Вивчення антиоксидантних властивостей ГЕЛББ здійснювали у тканині нирок за токсичної дії тетрахлорметану (ТХМ), яка виявляється за активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) (А.И.Гоженко и соавт., 2004). Через 1 годину після введення ГЕЛББ тваринам вводили підшкірно 50% олійний розчин ТХМ з розрахунку 0,7 мл на 100 г маси тіла (С.М.Дроговоз та співав., 2001). Через добу у тварин протягом 2-х годин збирали сечу при водному навантаженні 3 % від маси тіла тварини (О.В.Товчига та співавт., 2008). В сечі визначали концентрацію креатиніну, білка, іонів натрію і калію за вищезазначеними методами. У сироватці крові визначали концентрацію креатиніну та розраховували ШКФ, як зазначено вище. В гомогенаті нирок визначали концентрацію дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-реактивних продуктів (ТБК-Р) (И.Д.Стальная и соавт., 1977), відновленого глутатіону (ВГ) (E.D.Beutler at al., 1963) і активності каталази (М.А.Королюк та співавт., 1988). Визначали масу вилучених нирок для розрахунку КМН.

Відповідно до методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України проводили визначення параметрів гострої токсичності ГЕЛББ на щурах самцях при внутрішньошлунковому введенні (О.В.Стефанов, 2001). Ступінь класу токсичності оцінювали за класифікацією К.К.Сидорова (1973).

На другому етапі досліджували вплив ГЕЛББ на розвиток ураження нирок на моделі ЦД 1 типу у щурів в динаміці: через 1 і через 3 місяці від початку експерименту. Цукровий діабет, який тривав 1 місяць викликали підшкірним уведенням алоксану (Abhang organics, Індія) в дозі 150 мг/кг (О.В.Стефанов, 2001). Хворими на діабет вважали тих тварин, концентрація глюкози в крові яких становила ≥ 10 ммоль/л через тиждень розвитку захворювання. Лікування щурів починали з другого дня після ін'єкції алоксану і продовжували протягом місяця. Раз на тиждень визначали масу тварин і концентрацію глюкози в сироватці крові за допомогою наборів хіміреактивів фірми „Філісіт”, Україна. В кінці експерименту функціональний стан нирок досліджували за умов водного діурезу при 5% навантаженні за вищезазначеним методом. В сечі визначали концентрацію білка, креатиніну і сечовини. У сироватці

крові визначали концентрацію креатиніну, сечовини, іонів натрію і калію. Розраховували ШКФ, відносну реабсорбцію води, екскрецію креатиніну, сечовини та білка. Визначали масу нирок для розрахунку КМН. Усі перераховані методи дослідження описані в попередніх експериментах. Гістологічне дослідження нирок також здійснювали за вищезазначеними методами. Оцінювали ступінь гіалінізації клубочків та відкладення глікогену в епітелії ниркових каналців. Проводили морфометричне дослідження ниркових клубочків. На зрізах у полі зору мікроскопу (окуляр 10, об'єктив 10) у 3-5 повтореннях проводили підрахунок кількості клубочків з розподілом їх на звичайні, збільшені та зменшені за розміром з подальшим перерахуванням на 100 клубочків. Розмір клубочків (діаметр) вимірювали в умовних одиницях (у. о.) за допомогою окуляр-мікрометра (Э.Ф.Барінов и соавт., 2007).

Ураження нирок на тлі розвитку тривалого (3 місяці) ЦД у щурів самців викликали алоксаном у дозі 200 мг/кг (О.В.Стефанов, 2001). Хворими на діабет вважали тих тварин, концентрація глюкози в крові яких становила ≥ 10 ммоль/л через тиждень після введення токсиканту, тобто при розвинутій гіперглікемії, після чого починали введення ГЕЛББ, та продовжували протягом всього періоду спостереження. Кожного тижня визначали масу тварин. Концентрацію глюкози визначали за вищезгаданим методом кожні 2 тижні. По закінченні 3-х місяців досліду у щурів визначали показники периферичної крові: кількість лейкоцитів і еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, час скипання крові, ШОЕ та лейкоцитарну формулу (В.С.Камьшников, 2000), за даними якої розраховували інтегральні гематологічні індекси (Н.А.Белякова и соавт., 2010). Діурез у тварин визначали протягом 2 годин при 3% водному навантаженні за вищезазначеним методом. У сечі визначали концентрацію білка, креатиніну, сечовини, глюкози, іонів натрію, калію, кальцію за вищезазначеними методами, та хлоридів за допомогою набору хімреактивів фірми „Філісіт”, Україна. За масою нирок визначали КМН, як зазначено вище. В плазмі крові визначали показники системи згортання крові - протромбіновий час і концентрацію фібриногену, та показник системи фібринолізу - час лізису еуглобулінових згустків (В.В.Меньшиков и соавт., 1987). В сироватці крові визначали концентрацію глюкози, креатиніну, сечовини, іонів натрію, калію, кальцію, хлоридів за вищезазначеними методами та фосфору і загального білка за допомогою набору хімреактивів фірми „Філісіт”, Україна. Розраховували ШКФ, каналцеву реабсорбцію та екскрецію як зазначено вище. Гістологічне та морфометричне дослідження нирок проводили за вищезгаданими методами.

На третьому етапі у щурів моделювали експериментальний МС споживанням 10% розчину фруктози замість води (С.Ю.Штриголь та співавт., 2009). Протягом 5 тижнів щури, крім групи НК, замість питної води отримували розчин фруктози, після чого протягом 26 тижнів щури отримували додатково, в залежності від групи, воду, ГЕЛББ або драже „Канефрон[®]Н”. Кожного тижня визначали масу тварин. По закінченні експерименту у щурів досліджували показники периферичної крові, визначали час скипання та ШОЕ за вищезгаданими методами. Наявність у тварин інсулінорезистентності вивчали за допомогою короткого інсулінового тесту, результати якого подані як коефіцієнт чутливості до інсуліну (КЧІ) (О.В.Стефанов, 2001). У тварин визначали спонтанний добовий діурез. У сечі визначали концентрацію креатиніну. У сироватці крові визначали концентрацію креатиніну, глюкози та сечовини. Розраховували ШКФ, каналцеву реабсорбцію і екскрецію. В плазмі крові визнача-

ли протромбіновий час, концентрацію фібриногену та час лізису еуглобулінових згустків. Всі використані методи записані вище. Стан метаболізму ліпідів оцінювали за вмістом у сироватці крові тригліцеридів (ТГ), ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) і ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) за допомогою набору хімреактивів фірми „Філісіт”, Україна. За масою нирок визначали КМН. Гістологічне та морфометричне дослідження нирок проводили за вищезгаданими методами.

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики (вираховували середнє арифметичне та його стандартну похибку ($M \pm m$), або медіану та верхній і нижній процентілі Me (LQ; UQ)). Для отримання статистичних висновків застосовували однофакторний дисперсійний аналіз, або критерій Крускала-Уоліса для даних, які не підлягають нормальному закону розподілення. При виявленні відмінностей між експериментальними групами застосовували критерії Ньюмена-Кейлса для множинних порівнянь або критерій Мана-Уїтні при $p < 0,05$. Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм „Statistica, v. 6,0” (StatSoft inc. USA) (С.Н.Лапач та співавт., 2001).

Результати та їх обговорення. Результати скринінгових досліджень на щурах показали, що ГЕЛББ найбільшу гіпоазотемічну активність проявляє у дозі 7 мг/кг, на що вказує вірогідне зменшення ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК в сироватці крові концентрації сечовини і креатиніну на 46% і 37% відповідно. При вивченні нефропротекторної дії ГЕЛББ в порівнянні з драже „Канефрон[®]Н” на моделі ураження нирок хроматом калію на тлі їх введення спостерігали вірогідне зменшення КМН на 14% ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК. В групі ПК середні і виразні патологічні зміни у структурі нирок спостерігали у 80% тварин, а на тлі введення ГЕЛББ і драже „Канефрон[®]Н” кількість таких тварин зменшується до 20%.

При одноразовому введенні ГЕЛББ здоровим щурам як при спонтанному діурезі, так і в умовах водного навантаження не змінюється об’єм виділеної сечі у щурів. При введенні здоровим щурам ГЕЛББ протягом 7 днів спостерігали вірогідне збільшення ($p < 0,05$) діурезу в порівнянні з групою здорових тварин. Повторне введення ГЕЛББ і драже „Канефрон[®]Н” суттєво зменшує екскрецію білка, що вказує на капілярозміцнюючі властивості (В.А.Барабой, 1984).

Окиснювальний стрес і запалення – фактори, які є невід’ємною частиною патогенезу ХЗН і нерозривно пов’язані між собою (Ф.А.Тугушева и соавт., 2009). Густий екстракт з листя берези бородавчастої чинить протизапальну активність у фазі альтерації, вірогідно зменшуючи ($p < 0,05$) в порівнянні з вихідними даними площу ран на 54% на 8 день від початку відтворення ран. В групах ПК і драже „Канефрон[®]Н” на цей строк площа ран зменшилася невірогідно на 37% і 28% відповідно. У фазі ексудації ГЕЛББ вірогідно зменшує ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК набряк на 46% на 2 годину розвитку карагенінового набряку, пригнічуючи циклооксигеназу, і на 30% на першу годину розвитку зимозанового набряку, пригнічуючи ліпоксигеназу (О.В.Стефанов, 2001). На процеси проліферації ГЕЛББ не впливає. Драже „Канефрон[®]Н” не чинить антиексудативної і антипроліферативної дії. Аналгетична активність ГЕЛББ і драже „Канефрон[®]Н” склала 42% і 44% відповідно, що є нижче за активність диклофенаку натрію - 82%.

Під впливом ТХМ в нирках щурів групи ПК вірогідно зростає ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК концентрація ДК на 138%, ТБК-Р продуктів на 28%, в той же час від-

бувалася активація антиоксидантного захисту (АОС), на що вказує вірогідне підвищення в нирках на 42% концентрації ВГ, неспецифічної ланки АОС, який знешкоджує гідроксильні радикали та інші продукти ПОЛ (Ф.А.Тугушева и соавт., 2009). Висока концентрація ДК, первинних продуктів ПОЛ, сприяла активації ферментативного антиоксидантного захисту, про що свідчить підвищення активності каталази на 24% (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на стан системи ПОЛ/АОС в гомогенаті нирок щурів за умов моделювання тетрахлорметанового ураження нирок, $M \pm m$, $n=7$

Показники	НК	ПК	ГЕЛББ, 7 мг/ кг	„Канефрон [®] Н”, 20 мг/ кг
ДК, мкмоль/ г	4,81±0,30	11,43±1,09*	4,09±0,32**/**	5,62±0,50**
ТБК-Р, мкмоль/ г	100,4±4,5	128,2±3,2*	111,0±3,2**/**/**	95,4±3,1**
ВГ, мкмоль/ г	3,90±0,10	5,53±0,14*	5,82±0,08**/**	5,26±0,08*
Каталаза, мкат/ л	42,6±0,3	52,7±2,3*	28,6±3,0**/**/**	56,9±4,1*

Примітка. * - відхилення показника вірогідне відносно показника групи НК, $p < 0,05$; ** - відхилення показника вірогідне відносно показника групи ПК, $p < 0,05$; *** - відхилення показника вірогідне відносно показника групи тварин, які отримували драже „Канефрон[®] Н”, $p < 0,05$; n – кількість тварин у групі.

Густий екстракт з листя берези бородавчастої вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижує концентрацію ДК на 64% і ТБК-реактивних продуктів на 13%. Драже „Канефрон[®] Н” також вірогідно знижує вміст продуктів ПОЛ, вірогідно ($p < 0,05$) поступаючись групі ГЕЛББ за вмістом ВГ і перевершуючи за активністю каталази. Порушення стабільності клітинних мембран призводить до ушкодження ниркових структур, про що свідчить порушення видільної функції нирок (Ф.А.Тугушева и соавт., 2009). На тлі патології відбувалося накопичення в сироватці крові креатиніну, та зменшення таких показників: діурезу за 2 години, ШКФ, екскреції іонів калію і натрію. Зміни досліджуваних показників вірогідні ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК. Антиоксидантні властивості ГЕЛББ і драже „Канефрон[®] Н” сприяли збереженню ниркових структур та відновленню функцій нирок. Під впливом ГЕЛББ спостерігали вірогідне збільшення ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК діурезу на 29%, ШКФ на 50%, екскреції калію на 80%. На тлі введення драже „Канефрон[®] Н” також спостерігали вірогідне ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК збільшення діурезу, ШКФ, екскреції іонів калію, а також, на відміну від ГЕЛББ, збільшення екскреції іонів натрію. Результати дослідження свідчать про нефропротекторну активність ГЕЛББ та драже „Канефрон[®] Н”, що сприяє збереженню функцій нирок у дослідних тварин.

Результати вивчення гострої токсичності ГЕЛББ свідчать, що LD_{50} лежить за межами дози 5000 мг/кг. Отримані дані дозволяють класифікувати ГЕЛББ як „практично нетоксичну речовину” відповідно до загальноприйнятої класифікації (К.К.Сидоров, 1973).

На моделі ЦД 1 типу, який тривав 1 місяць, у тварин групи ПК концентрація глюкози в крові була на рівні 14 ммоль/л. На незадовільну функцію нирок, через місяць розвитку патології, вказує підвищення рівня креатиніну, сечовини і натрію в сироватці крові. Коефіцієнт маси нирок вірогідно зріс ($p < 0,05$) в порівнянні з гру-

пою НК на 38%. Вивчення морфологічної будови нирок показало початкові ознаки розвитку гломерулосклерозу, про що свідчить вузликова гіалінізація клубочків. Під впливом ГЕЛББ і драже „Канефрон®Н” у щурів на третій тиждень розвитку патології зменшується рівень гіперглікемії. Вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижується концентрація в крові продуктів азотистого обміну, натрію та КМН. Морфологічні дослідження нирок підтвердили, що ГЕЛББ і драже „Канефрон®Н” зменшують інтенсивність ураження клубочків нирок.

Для отримання більш чіткої картини розвитку у щурів ДН в наступному експерименті тварин з ЦД 1 типу утримували протягом 3 місяців. Середній рівень концентрації глюкози в крові тварин групи ПК через три тижні від початку і до кінця експерименту становить від 16 до 18 ммоль/л. Густий екстракт з листя берези бородавчастої вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК протягом всього експерименту знижує концентрацію глюкози в крові щурів до 10 - 14 ммоль/л. Драже „Канефрон®Н” вірогідно не змінює стан гіперглікемії у тварин. При ЦД 1 типу спостерігали відсутність приросту маси тіла у щурів протягом 3 місяців. Вірогідне ($p < 0,05$) у порівнянні з групою ПК збільшення маси тіла у щурів, яким вводили ГЕЛББ і драже „Канефрон®Н”, відбувається в кінці експерименту - на 13 і 14 тижні. Тривала стійка гіперглікемія негативно вплинула на функцію нирок. На тлі патології у щурів розвинулася поліурія, глюкозурія, протеїнурія, спостерігали зменшення реабсорбції натрію, збільшення екскреції усіх вивчених електролітів (рис. 1). Густий екстракт з листя берези бородавчастої на тлі ЦД знижує поліурію, глюкозурію, протеїнурію, збільшує реабсорбцію натрію, майже в 3 рази зменшує екскрецію натрію, калію, кальцію та хлоридів. На тлі введення драже „Канефрон®Н” також вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК зменшується глюкозурія та екскреція калію і хлоридів. На зменшення протеїнурії, екскреції натрію і кальцію, а також на збільшення реабсорбції натрію драже „Канефрон®Н” вірогідно не впливає.

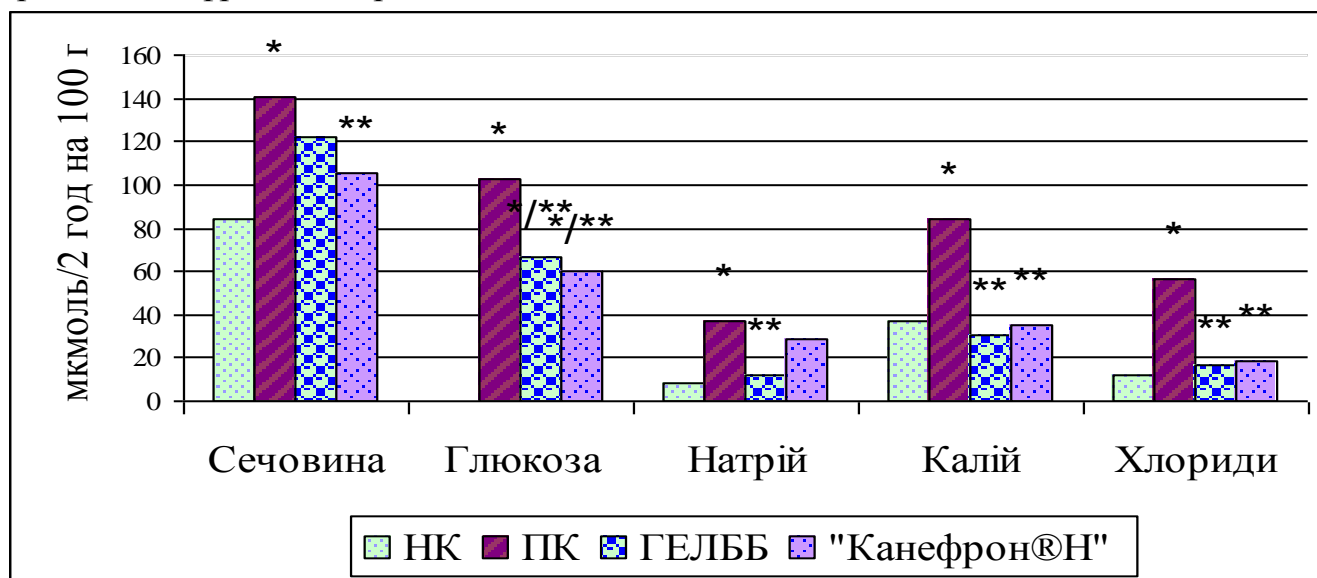


Рис. 1 Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на екскреторну функцію нирок щурів через 3 місяці після введення алоксану

Примітка. * - відхилення показника вірогідне відносно показника групи НК, $p < 0,05$; ** - відхилення показника вірогідне відносно показника групи ПК, $p < 0,05$.

Відомо, що при дефіциті інсуліну підсилюється стимулюючий вплив глюкагону на глюконеогенез, це спричиняє використання амінокислоти аланіну для синтезу глюкози у печінці та підсиленого розпаду тканинного білка, який є джерелом цієї амінокислоти (О.В.Граніна, 2009). Підтвердженням цьому було значне підвищення концентрації сечовини, як основного метаболіту білка, в сироватці крові щурів групи ПК на 146%. Під впливом ГЕЛББ концентрація сечовини в сироватці крові вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижується на 41%, що вказує на зменшення розпаду білка, так як її виведення нирками не збільшується. Характерною особливістю ЦД 1 типу є зниження концентрації білка в сироватці крові, що і спостерігається у всіх експериментальних групах. Підвищений осмотичний тиск сечі при глюкозурії призводить до втрати організмом електролітів (В.Р.Дрель, Н.О.Сибірна, 2009), про що свідчить вірогідне ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК зниження в сироватці крові концентрації кальцію та хлоридів. Густий екстракт з листя берези бородавчастої та „Канефрон[®]Н” вірогідно підвищують концентрацію хлоридів в крові, концентрація натрію і кальцію залишається низькою.

При ураженні нирок на тлі тривалого перебігу ЦД у щурів вірогідно ($p < 0,05$) щодо групи тварин НК скорочується час скипання крові на 32%, підвищується концентрація фібриногену в крові на 40% і сповільнюється лізис еуглобулінових згустків на 54%. Вказана динаміка показників свідчить про підвищення коагуляційних властивостей крові, що на тлі зниження фібринолітичної активності може призвести до порушення мікроциркуляції. На тлі введення тваринам ГЕЛББ вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК збільшується час скипання крові на 32% і знижується час лізису еуглобулінових згустків більше ніж у 2 рази. Драже „Канефрон[®]Н” також вірогідно ($p < 0,05$) збільшує час скипання крові на 29%, але не впливає вірогідно на час лізису еуглобулінових згустків. Отже, ГЕЛББ дещо суттєвіше впливає на урівноваження гемостазу та відновлення фібринолізу, ніж препарат порівняння. Концентрація фібриногену в крові свідчить не тільки про порушення в системі гемостазу, але також про системне запалення. Крім концентрації фібриногену, про запалення в організмі свідчать такі показники як ШОЕ, кількість лейкоцитів в крові та їх співвідношення. В даному експерименті на тлі патології крім зростання концентрації фібриногену в крові майже в два рази зростає показник ШОЕ. Під впливом ГЕЛББ вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижується концентрація фібриногену на 40%, і ШОЕ на 42%. Драже „Канефрон[®]Н” не впливає вірогідно на ці показники. Загальне підвищення у щурів всіх дослідних груп з патологією кількості лейкоцитів не носить вірогідного характеру, та знаходиться у межах фізіологічної норми. У лейкоцитарній формулі групи тварин ПК спостерігали вірогідні ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК зміни: підвищення сегментоядерних нейтрофілів з 16% до 18,5%, зниження лімфоцитів з 75% до 69%, та 2-х разове збільшення еозинофілів. На тлі введення ГЕЛББ вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК відбувається зниження сегментоядерних нейтрофілів до 16% і збільшення лімоцитів до 72,5%, еозинофіли залишаються на рівні групи ПК, та вірогідно ($p < 0,05$) вищими, ніж в групі „Канефрон[®]Н”. Драже „Канефрон[®]Н” не впливає вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК на відсоток сегментоядерних нейтрофілів і лімфоцитів. За показниками лейкоцитарної формули розраховували лейкоцитарний індекс інтоксикації (ЛІІ) і індекс зсуву лейкоцитів (ІЗЛ), які на тлі ЦД збільшуються на 22% і 27% відповідно, та лі-

мфоцитарно-гранулоцитарний індекс (ЛГІ), який зменшується на 22% (рис.2). Результати розрахунків вказують на підвищення рівня ендогенної інтоксикації у щурів в результаті процесів тканинного розпаду. Токсичні продукти, що при цьому утворюються, запускають запальний процес, який пояснює переважання сегментоядерних нейтрофілів.

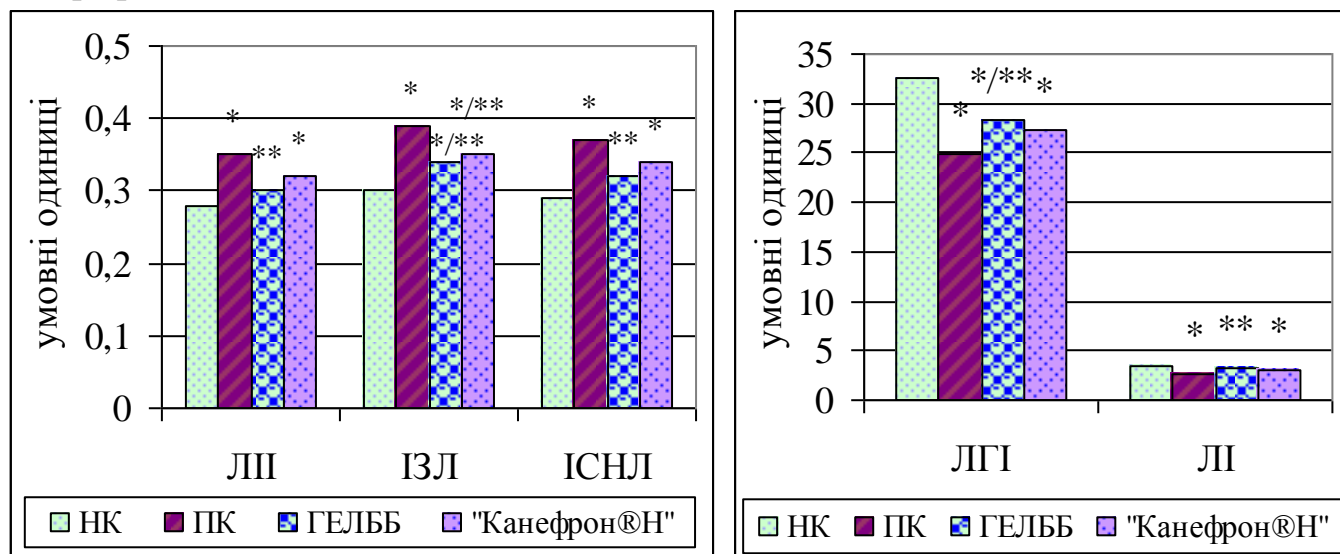


Рис. 2 Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на лейкоцитарні індекси через 3 місяці після введення алоксану

Примітка. ЛПІ – лейкоцитарний індекс інтоксикації; ІЗЛ – індекс зсуву лейкоцитів; ІСНЛ – індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів; ЛГІ - лейкоцитарно-гранулоцитарний індекс; ЛІ – лейкоцитарний індекс; * - відхилення показника вірогідне відносно показника групи НК, $p < 0,05$; ** - відхилення показника вірогідне відносно показника групи ПК, $p < 0,05$.

Під впливом ГЕЛББ вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижується ЛПІ на 14%, ІЗЛ знижується на 12%, а ЛГІ підвищується на 15%. На тлі введення драже „Канефрон®Н” відбувається зниження ІЗЛ на 9%, ЛГІ та ЛПІ залишаються незмінними. В групі ПК вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК зниження лейкоцитарного індексу (ЛІ) на 23% та підвищення індексу співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів (ІСНЛ) на 25% свідчить про порушення імунологічної реактивності внаслідок пригнічення гуморального та активації неспецифічного рівня імунного захисту (І.Бродяк, Н.Сибірна, 2006). На тлі введення ГЕЛББ вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК ЛІ підвищується на 21%, і ІСНЛ знижується на 15%, а на тлі введення драже „Канефрон®Н” залишалися на рівні групи ПК.

На тлі ЦД у нирках щурів групи ПК відбуваються значні структурні зміни патологічного характеру. Коефіцієнт маси нирок зростає в 2 рази, а ГЕЛББ і драже „Канефрон®Н” сприяють вірогідному ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК зниженню його на 15% і 13% відповідно. У клітинах більшості висхідних частин петель Генле та каналців проксимальних частин нефронів у групі ПК виявлено виразне відкладення глікогену (рис.3). Розповсюдженими є судинні клубочки, які мають вигляд зморщених округлих утворень. Вони суцільно зафарбовуються ШПК–позитивно, що вказує на гіаліноз. У частини ниркових клубочків гіалінізація мала вузликовий характер (рис.4). Тривалий перебіг ЦД призводить до гіалінізації та склерозування клубочків, що зме-

ншує їх у розмірі, та компенсаторного надмірного збільшення функціонуючих клубочків. В результаті спостерігали зростання частки збільшених клубочків на 92%, та зменшених – на 108%. Частка нормальних за розміром клубочків зменшилася на 35%. Густий екстракт з листя берези бородавчастої сприяє покращенню морфологічної картини нирок. Відкладення глікогену виявлено тільки у висхідних частинах коротких петель деяких нефронів. Гіалінізація клубочків зменшилася. Розподіл клубочків за розміром знаходиться майже на рівні здорових щурів. Мезангіум теж в основному відповідає нормальному стану. На тлі введення драже „Канефрон[®]Н” патологічні зміни у каналцевому апараті нирок також зменшуються. Стан судинних клубочків за чіткістю малюнка капілярних петель, виразністю ознак гіалінізації, станом базальних мембран та мезангіуму є ближчим до такого після введення ГЕЛББ (рис. 4).

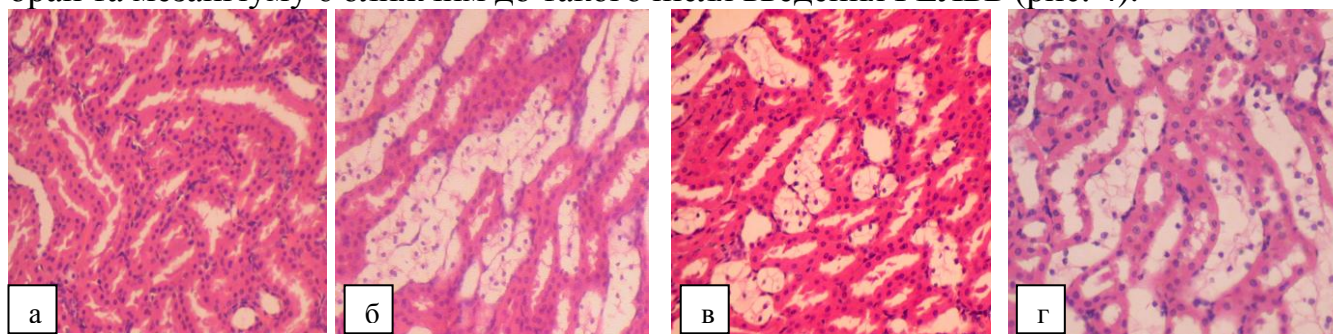


Рис. 3 Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ) на відкладення глікогену у епітеліальних клітинах висхідної частини коротких петель Генле (кіркова речовина): а – негативний контроль, б – позитивний контроль, в – ГЕЛББ, г – драже „Канефрон[®]Н”. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

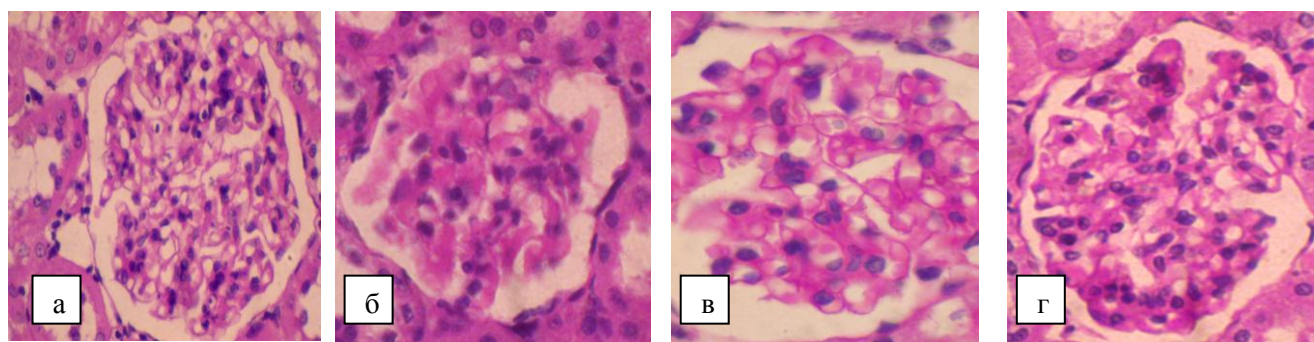


Рис. 4 Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ) на гіалінізацію капілярних гломерулярних петель: а – негативний контроль, б – позитивний контроль, в – ГЕЛББ, г – драже „Канефрон[®]Н”. ШК-реакція, $\times 1000$.

У тварин з експериментальним МС відбувається зростання маси тіла. На інсулінорезистентність вказує вірогідне ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК зниження КЧІ на 34% (табл. 2). Атерогенним чинником вважається підвищення в крові ЛПНЩ і тригліцеридів та зниження ЛПВЩ (О.А.Чучелина та співавт., 2013). В крові щурів вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою НК зростає концентрація ЛПНЩ на 13% та тригліцеридів на 46%. Введений тваринам протягом 26 тижнів ГЕЛББ сприяє уповільненню збільшення маси на 10,6%, в крові вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижуються показники ліпідного обміну. Інсулінорезистентність у тварин,

які отримували ГЕЛББ і драже „Канефрон[®]Н”, не розвивалася. Драже „Канефрон[®]Н” також вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК знижує масу тварин і концентрацію тригліцеридів.

З наростанням важкості МС частота і виразність протромботичних і прозапальних процесів збільшується (Т.М.Амбросова, 2013). У щурів групи ПК скорочується протромбіновий час і компенсаторно підвищується фібринолітична активність. Густий екстракт з листя берези бородавчастої сприяє вірогідному ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК збільшенню протромбінового часу на 9% та збільшенню часу лізису еуглобулінових згустків на 92%. Драже „Канефрон[®]Н” також сприяє урівноваженню гемостазу та відновленню фібринолізу. Запалення відіграє дуже важливу роль у розвитку судинних ускладнень на тлі МС і ЦД (В.Шварц, 2009). У щурів з модельною патологією зростає показник ШОЕ та збільшується кількість лейкоцитів, що узгоджується з даними літератури (К.П.Зак та співав., 2013). Густий екстракт з листя берези бородавчастої та драже „Канефрон[®]Н” вірогідно ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ПК зменшували ШОЕ більше, ніж у 2 рази, та зменшували кількість лейкоцитів на 22% і 21% відповідно.

Таблиця 2

Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на показники ліпідного обміну та коефіцієнт чутливості до інсуліну у щурів з метаболічним синдромом, викликаним надмірним споживанням фруктози, (n=8)

Показники	НК	ПК	ГЕЛББ, 7 мг/ кг	„Канефрон [®] Н”, 20 мг/ кг
КЧІ, % <i>Me (LQ;UQ)</i>	44,2 (38,9;46,5)	26,4* (24,4;34,4)	41,1** (36,3;48,3)	41,4** (32,3;46,2)
ЛПНЩ, ммоль/ л <i>M±m</i>	1,78±0,03	2,01±0,07*	1,77±0,04**	1,83±0,04
ЛПВЩ, ммоль/ л <i>M±m</i>	0,46±0,02	0,56±0,01	0,52±0,03	0,55±0,05
ТГ, ммоль/ л <i>M±m</i>	0,35±0,03	0,51±0,05*	0,36±0,03**	0,31±0,04**

Примітка. * - відхилення показника вірогідне відносно показника групи НК, $p < 0,05$; ** - відхилення показника вірогідне відносно показника групи ПК, $p < 0,05$; n – кількість тварин у групі.

Відомо, що у хворих з МС екскреторна функція нирок уповільнена (В.М.Рибальченко та співавт, 2010). Дослідження функції нирок на тлі МС показує, що в усіх тварин, які отримували фруктозу, знижується концентрація натрію в сечі, зростає його реабсорбція і зменшується екскреція. Концентрація натрію в крові щурів, які споживали фруктозу, майже не змінилася. Це можна пояснити тим, що при МС блокуються трансмембранні іонообмінні механізми Na^+ -, K^+ - залежної АТФ-ази, підвищуючи тим самим вміст внутрішньоклітинного Na^+ , зменшуючи вміст K^+ , що призводить до збільшення чутливості судинної стінки до пресорних впливів, підвищується реабсорбція натрію і вміст його в стінках судин (Е.Ю.Федорова и соавт., 2006). Отже, часткове усунення метаболічних порушень, системного запалення та зміни механізмів зсідання крові при введенні ГЕЛББ, незважаючи на відсутність позитивного впливу на функцію нирок, сприяє збереженню структури нирок, усуваю-

чи гіпертрофію клубочків, характерну для початкових стадій ДН, на 45%. На тлі введення „Канефрон[®]Н” також спостерігали покращення метаболічних процесів, зниження виразності запалення та відновлення показників системи гемостазу, що також позитивно впливає на морфоструктуру нирок.

ВИСНОВКИ

В усьому світі діабетична нефропатія і, як наслідок, ниркова недостатність займає лідерські позиції в причинах смерті хворих на цукровий діабет. В Україні у 2013 році зареєстровано більше 80 тис. пацієнтів з діабетичною нефропатією. За прогнозами, на 2025 рік третину всіх хворих, яким необхідно буде проведення систематичного гемодіалізу, становитимуть пацієнти з цукровим діабетом (А.В.Бабушкіна, 2015).

Дисертаційна робота присвячена вирішенню актуального наукового завдання, яке полягає у експериментальному обґрунтуванні доцільності створення рослинного засобу на основі густого екстракту з листя берези бородавчастої для профілактики та лікування діабетичної нефропатії. Доведено, що ефективність густого екстракту з листя берези бородавчастої обумовлена його комплексним механізмом нефропротекторної та антидіабетичної дії. Результати дослідження гострої токсичності густого екстракту з листя берези бородавчастої свідчать про його нешкідливість.

1. Густий екстракт з листя берези бородавчастої на моделі ушкодження нирок, викликаного хроматом калію, чинить гіпоазотемічну дію, вірогідно зменшуючи концентрацію сечовини на 46% і креатиніну на 37%, і нефропротекторну дію на рівні препарату порівняння драже „Канефрон[®]Н” у дозі 20 мг/кг. Ефективна доза густого екстракту з листя берези бородавчастої за гіпоазотемічною активністю складає 7 мг/кг.

2. Спонтанний діурез у щурів при повторному введенні густого екстракту з листя берези бородавчастої збільшується на 98% і є більш інтенсивним, ніж при введенні драже „Канефрон[®]Н”. При цьому обидва препарати чинять виразну ($p < 0,05$) антипротеїнуричну дію.

3. Густий екстракт з листя берези бородавчастої чинить протизапальну дію в фазі альтерації і не впливає на фазу проліферації. В фазі ексудації на моделі карагенінового набряку стопи густий екстракт з листя берези бородавчастої чинить максимальну протизапальну дію 46%, на моделі зимозанового набряку максимальна протизапальна дія становить 30%. У препарату порівняння, драже „Канефрон[®]Н” на вивчених моделях протизапальна дія відсутня.

4. На моделі тетрахлорметанового ураження нирок густий екстракт з листя берези бородавчастої чинить виразну антиоксидантну дію, зменшуючи в гомогенаті нирок вміст дієнових кон’югатів на 64% і ТБК-реактивних продуктів на 13%, що позначається на відновленні сечовидільної функції нирок (збільшення діурезу на 29%, збільшення швидкості клубочкової фільтрації на 50%, збільшення виведення калію на 80%) на рівні препарату порівняння, драже „Канефрон[®]Н”.

5. Дослідження гострої токсичності густого екстракту з листя берези бородавчастої при одноразовому внутрішньошлунковому введенні щурам самцям у дозі 5000 мг/кг дає підставу віднести його до V класу токсичності - „практично нешкідливі речовини” ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

6. Густий екстракт з листя берези бородавчастої чинить нефропротекторний ефект на моделі експериментального цукрового діабету 1 типу, викликаного алокса-

ном, в динаміці через 1 і 3 місяці. Дослідний екстракт впливає на основні патогенетичні чинники розвитку діабетичної нефропатії, покращуючи вуглеводний (зниження концентрації глюкози в крові протягом всього часу експерименту в середньому на 25%) та білковий обмін, урівноважуючи систему згортання крові, зменшуючи ($p < 0,05$) системне запалення за гематологічними показниками, що позитивно впливає на екскреторну функцію нирок (зменшення протеїнурії на 39%, глюкозурії - на 35%, зменшення виведення основних електролітів в 3 рази) та зберігає їх будову, зменшуючи прояви розвитку гломерулосклерозу. Драже „Канефрон[®] Н” поступається густому екстракту з листя берези бородавчастої за впливом на порушення вуглеводного обміну та розвиток діабетичної нефропатії.

7. На моделі експериментального метаболічного синдрому густий екстракт з листя берези бородавчастої зменшує інсулінорезистентність (КЧІ на 40%) та гіпертригліцеридемію на 46%, впливає на прояви системного запалення (зменшення ШОЕ в 2,3 разу і кількості лейкоцитів на 22%), що сприяє збереженню будови нирок. Ефективність густого екстракту з листя берези бородавчастої на даній моделі була на рівні драже „Канефрон[®] Н”.

8. Результати експериментального дослідження нефропротекторної активності густого екстракту з листя берези бородавчастої при ураженні нирок на тлі порушень вуглеводного обміну виступають вагомим обґрунтуванням перспективності подальшої розробки лікарського засобу, призначеного для застосування у схемах для уповільнення розвитку діабетичної нефропатії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Яковлева Л. В. Вивчення впливу густого екстракту з листя берези на морфологію нирок при експериментальній нирковій недостатності у щурів / Л.В.Яковлева, Ю. Б. Лар'яновська, Н. С. Чорна // Клінічна фармація. – 2005. – Т.9, № 3. – С. 56-62 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

2. Яковлева Л. В. Вивчення протизапальної та анальгетичної дії густого екстракту з листя берези бородавчастої / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Т. К. Юдкевич // Клінічна фармація. – 2010 – Т.14, №4. – С. 54-57 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

3. Нефропротекторна дія густого екстракту з листя берези бородавчастої на тлі розвитку експериментальної діабетичної нефропатії у щурів / Н. С. Чорна, Ю. Б. Лар'яновська, О. М. Горбань, Т.К. Юдкевич, Д.М. Бабенко // Клінічна фармація. – 2012. – Т.16, №1. – С. 60-65 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

4. Чорна Н. С. Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на стан нирок у щурів за умов експериментального цукрового діабету, викликаного алоксаном / Н. С. Чорна, Ю. Б. Лар'яновська, Д. М. Бабенко // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012. – №2. – С. 143-146 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

5. Яковлева Л. В. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи та функції нирок щурів під впливом густого екстракту з листя берези бородавчастої на тлі отруєння тетрахлорметаном / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Д. М. Бабенко // Буковинський медич-

ний вісник. – 2012. – Т.16, №3, ч.2. – С. 249-252 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

6. Корекція густим екстрактом із листя берези бородавчастої порушень у системі гемостазу щурів за умов ураження нирок на тлі експериментального цукрового діабету / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Т. І. Дейнеко, Д. М. Бабенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – №4 (29). – С. 61-66 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

7. Яковлева Л. В. Порівняльна характеристика розвитку діабетичної нефропатії через 1 і через 3 місяці від початку індукції інсулінозалежного цукрового діабету та вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на її прогресування / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Д. М. Бабенко // Медична хімія. – 2013. – Т.15, №3. – С. 44-47 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

8. Чорна Н. С. Діуретична активність густого екстракту з листя берези бородавчастої / Н. С. Чорна, Л. В. Яковлева // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – №5 (28). – С. 21-24 (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

9. Яковлева Л. В. Влияние густого экстракта листьев березы бородавчатой на развитие нефропатии у крыс на фоне метаболического синдрома [Електронний ресурс] / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Ю. Б. Ларьяновская // Universum: медицина и фармакология: електрон. научн. журн. – 2016. – №5 (27). Режим доступу: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/3192> (*Особистий внесок: участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, підготовка статті*).

10. Патент 95690 України, МПК (51): А61К 36/185 (2006.01), А61Р 7/10 (2006.01), А61Р 31/00 (2006.01). Спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією з листя берези / О. П. Хворост, В. С. Кисличенко, Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – № а200912704; заявл. 07.12.2009; опубл. 25.08.2011, бюл. № 16. – 5 с. (*Особистий внесок: патентний пошук, участь у виконанні експериментальної частини, аналіз даних, участь у підготовці патенту*).

11. Яковлева Л. В. Вивчення антиоксидантних властивостей густого екстракту з листя берези бородавчастої / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна // Людина та ліки – Україна : матеріали IV Національного конгресу, м. Київ, 23-25 березня 2011 р. – Київ, 2011. – С. 137-138.

12. Яковлева Л. В. Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на функцію нирок за умов їх ураження тетрахлорметаном / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №5 – С. 387-388.

13. Яковлева Л. В. Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на розвиток інсулінорезистентності у щурів при тривалому споживанні високих доз фруктози / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна // Хімія природних сполук : матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції, м. Тернопіль, 30-31 жовтня 2012 р. – Тернопіль, 2012. – С. 100-101.

14. Яковлева Л. В. Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої на ліпідний спектр крові у щурів в умовах експериментального метаболічного синдрому / Л.

В. Яковлева, Н. С. Чорна // Клінічна фармація: 20 років в Україні : матеріали Національного конгресу, м. Харків, 21-22 березня 2013 р. – Харків, 2013. – С. 256.

15. Яковлева Л. В. Дослідження гострої токсичності густого екстракту з листя берези бородавчастої / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали XXX Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Харків, 23 травня 2013 р. – Харків, 2013. – С. 126.

16. Яковлева Л. В. Морфологические изменения почечных телец на фоне повышенного потребления фруктозы и коррекция их густым экстрактом листьев березы бородавчатой / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна, Ю. Б. Ларьяновская // Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом : материалы научно-практической конференции с международным участием, г. Пермь, 21-23 ноября 2013 г. – Пермь, 2013. – С. 191-193.

17. Яковлева Л. В. Вплив густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ) на стан нирок у щурів при патологіях, пов'язаних з порушенням вуглеводного обміну / Л. В. Яковлева, Н. С. Чорна // Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали науково-практичної internet-конференції, м. Харків, 21-23 березня 2016 р. – Харків, 2016. – С. 278-279.

АНОТАЦІЯ

Чорна Н.С. Фармакологічне обґрунтування застосування густого екстракту з листя берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.) для лікування діабетичної нефропатії. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.– Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Робота присвячена фармакологічному дослідженню густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ). На моделі ураження нирок хроматом калію дослідили гіпоазотемічну і нефропротекторну дію ГЕЛББ, та визначили його найбільш ефективну дозу, яка склала 7 мг/кг. На наступному етапі досліджень визначили діуретичну, протизапальну та антиоксидантну дії. На моделі цукрового діабету 1 типу при вивченні в динаміці через 1 і 3 місяці розвитку діабетичної нефропатії виявили, що ГЕЛББ зменшував прояви вуглеводних та білкових порушень, зменшував системне запалення, урівноважував систему згортання крові та систему фібринолізу, покращував лейкоцитарний склад крові. Сукупність цих фармакодинамічних проявів сприяла уповільненню розвитку діабетичної нефропатії, на що вказує покращення видільної функції нирок та зменшення ознак розвитку гломерулосклерозу при морфологічному вивченні. На моделі метаболічного синдрому ГЕЛББ зменшує інсулінорезистентність та гіперліпідемію, що сприяє збереженню морфологічної структури нирок. Густий екстракт з листя берези бородавчастої є перспективним для розробки лікарського засобу для профілактики та комплексного лікування діабетичної нефропатії.

Ключові слова: густий екстракт листя берези бородавчастої, діабетична нефропатія, цукровий діабет, експериментальні дослідження.

АННОТАЦИЯ

Чорна Н.С. Фармакологическое обоснование применения густого экстракта листьев березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.) для лечения диабетической нефропатии. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология.– Национальный фармацевтический университет МОЗ Украины, Харьков, 2016.

В диссертации изучали фармакодинамику густого экстракта листьев березы бородавчатой (ГЭЛББ). На модели поражения почек хроматом калия ГЭЛББ оказывает гипоазотемическое действие, уменьшая концентрацию мочевины на 46% и креатинина на 37% на уровне препарата сравнения драже «Канефрон®Н». Наибольшую гипоазотемическую активность ГЭЛББ проявляет в дозе 7 мг/кг. Морфологические исследования почек показали, что ГЭЛББ, как и драже «Канефрон®Н», защищают почечную ткань от нефротоксина.

Густой экстракт листьев березы бородавчатой при повторных введениях способствует увеличению диуреза на 98%. При этом наблюдали снижение экскреции белка на 29%. Драже «Канефрон®Н» увеличивает диурез на 30% и снижает экскрецию белка на 28%.

Густой экстракт листьев березы бородавчатой, в отличие от драже «Канефрон®Н», оказывает противовоспалительное действие в фазах альтерации и экссудации. На модели каррагенинового отека ГЭЛББ уменьшает экссудацию первые 4 часа, наибольшую эффективность проявляя на 2 час, антиэкссудативное действие на модели зимозанового отека указывает на угнетение лейкотриенов. Препарат сравнения и густой экстракт листьев березы бородавчатой не оказывают противовоспалительного действия в фазе пролиферации.

Исследуемый густой экстракт оказывает выраженное антиоксидантное действие на модели поражения почек тетрахлорметаном. Продукты перекисного окисления липидов, такие как диеновые конъюгаты на фоне введения ГЭЛББ снижались на 64%, а ТБК-реагенты на – 13%. Это положительно влияло на сохранение функций почек, о чем свидетельствовало восстановление диуреза и скорости клубочковой фильтрации. Драже «Канефрон®Н» также оказывает антиоксидантное действие, что способствует сохранению функции почек.

Исследование острой токсичности ГЭЛББ при однократном внутривенном введении крысам самцам в дозе 5000 мг/кг дает основание отнести его к V классу токсичности – «практически безвредные вещества» ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

Густой экстракт листьев березы бородавчатой оказывает нефропротекторный эффект на модели сахарного диабета 1 типа, вызванного подкожным введением раствора аллоксана. Положительный эффект ГЭЛББ наблюдали как через 1, так и через 3 месяца начала развития патологии. В течение всего исследования наблюдали снижение глюкозы в крови на 25%. Об улучшении белкового обмена свидетельствует замедление снижения массы животных, а также снижение концентрации мочевины в крови без увеличения ее экскреции, что указывает на уменьшение катаболических процессов. Густой экстракт положительно влияет на время свертывания крови и время лизиса эуглобулиновых сгустков, а также на показатели, свидетельствующие о системном воспалении, такие как СОЭ, концентрация фибриногена, соотношение

видов лейкоцитов. Комплекс вышеперечисленных эффектов положительно влияет на экскреторную функцию почек (уменьшение протеинурии на 39%, глюкозурии на 35%, уменьшение выведения основных электролитов в 3 раза) и улучшает их структуру, уменьшая проявления гломерулосклероза, о чем свидетельствуют морфологические исследования. Густой экстракт листьев березы бородавчатой, как и препарат сравнения драже «Канефрон[®] Н», оказывали влияние на основные патогенетические механизмы развития диабетической нефропатии.

На модели экспериментального метаболического синдрома ГЭЛББ уменьшает инсулинорезистентность (коэффициент чувствительности к инсулину на 40%), а также концентрацию в крови липопротеидов низкой плотности на 12% и триглицеридов на 29%. Введение ГЭЛББ оказывает положительное влияние на показатели, свидетельствующие о нарушении гемостаза и развитии системного воспалительного процесса. Это способствует сохранению почечной ткани, что подтверждено морфологически.

Экспериментальное исследование нефропротекторной активности ГЭЛББ при повреждении почек на фоне нарушений углеводного обмена выступает патогенетическим обоснованием для разработки лекарственного средства для лечения и замедления развития диабетической нефропатии в комплексной терапии.

Ключевые слова: густой экстракт листьев березы бородавчатой, диабетическая нефропатия, сахарный диабет, экспериментальные исследования.

SUMMARY

Chorna N.S. Pharmacological substantiation of the semi-solid extract of birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) leaves use for the treatment of diabetic nephropathy. – The manuscript.

The thesis for a Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree by the speciality 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy of Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2016.

The dissertation is dedicated to the pharmacological investigation of semi-solid extract of birch leaves (SSEBL). On the model of potassium chromate-induced nephropathy hypoazotemic and nephroprotective effects were studied, that allowed determining of the most effective dose which equalled 7 mg/kg. At the next stage of the experiments diuretic, anti-inflammatory, and antioxidant effects were evaluated. On the model of type 1 diabetes mellitus, using the study in the dynamics of nephropathy development, namely after 1 and 3 months, SSEBL decreased the signs of carbohydrate and protein metabolism disorders, reduced systemic inflammation, counterbalanced the processes of blood clotting and fibrinolytic system, normalized leukocyte formula of blood. In total, these pharmacodynamic features resulted in the retardation of diabetic nephropathy progression, as evidenced by normalization of the excretory renal function and reduction in the morphological signs of glomerulosclerosis. On the model of the metabolic syndrome SSEBL decreased insulin resistance and hyperlipidemia, thus contributing to the maintenance of the kidney histological structure. Semi-solid extract of birch leaves is a promising basis for the development of a drug for the prophylaxis and combined treatment of diabetic nephropathy.

Key words: the semi-solid extract of birch leaves, diabetic nephropathy, diabetes mellitus, experimental studies.

Підписано до друку 12.12.2016 р. Формат 60×90/16. Папір офсет. Друк офсет.
Умов. друк. арк.. 0,8. Тираж 100 прим. Замовл. № 314/12
Надруковано у копії-центрі «МОДЕЛІСТ», ФО-П Миронов М.В.,
м. Харків, вул. Мистецтв, 3 літер Б-1.
Тел. (057) 7-170-354 e-mail: kmodelist@ukr.net
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ВО 4 №022953