

ВІДЗИВ
офіційного опонента на дисертацію Ситник Інни Миколаївни
«ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ N-
АЦЕТИЛЦИСТЕЇНУ ТА ЛОЗАРТАНУ ПРИ КАРДІАЛЬНИХ ПОРУ-
ШЕННЯХ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ»
на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук
за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, 22 – охорона здоров'я

Актуальність обраної теми І.М. Ситник «Фармакологічне обґрунтування застосування N-ацетилцистеїну та лозартану при кардіальних порушеннях цукрового діабету 1 типу» обумовлена значною поширеністю цукрового діабету (ЦД) та його ускладнень. Розповсюдженість ЦД стрімко зростає, тому ВООЗ визначає ЦД як неінфекційну епідемію. За прогнозами експертів Міжнародної діабетичної федерації у 2035 р. загальна чисельність хворих на ЦД досягне 592 млн. осіб, 10% з яких складатимуть хворі на ЦД 1 типу. За останні 10 років кількість хворих на ЦД в Україні зросла більш ніж у 1,5 рази і сьогодні становить понад 1,3 млн. Розвиток ЦД супроводжується серйозними ускладненнями, як от кардіоміопатії, ангіопатії, ретинопатії, нефропатії тощо. Відомо, що діабетична кардіоміопатія (ДК) діагностується у понад 30% хворих на ЦД 1 типу. Тому оптимізація терапії та попередження ДК є однією з актуальних медичних проблем.

Одним зі шляхів фармакокорекції ДК на тлі ЦД є вплив на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему (РААС), перш за все, за допомогою антагоністів рецепторів ангіотензину II, які володіють потужними кардіопротекторними властивостями. Згідно сучасних уявлень, одним із ключових механізмів виникнення ДК є оксидативний стрес (ОС). Тому в терапії ДК сьогодні розглядаються фармакологічні підходи, спрямовані на попередження та лікування ОС. Важливе місце в попередженні та терапії кардіальних порушень при ЦД посідають антиоксиданти.

Перспективним напрямком оптимізації терапії ДК є комплексне застосування антагоністів рецепторів ангіотензину II та антиоксидантів, що дозволить не тільки потенціювати кардіопротекторну дію, але й надасть змогу вплинути на основні патогенетичні ланки захворювання.

Об'єктом дослідження стала фармакокорекція кардіальних порушень при ЦД 1 типу.

Вищевикладене свідчить про соціальну значущість, актуальність та доцільність наданої для рецензування науково-дослідної роботи Ситник Інни Миколаївни, а представлені у дисертації дослідження, які полягають у експериментальному обґрунтуванні доцільності комплексного застосування антагоніста рецепторів ангіотензину II лозартану та антиоксиданта N-ацетилцистеїну для попередження та лікування ДК на тлі ЦД 1 типу, дозволять оптимізувати комплексну терапію кардіологічних ускладнень ЦД.

Зв'язок теми дисертації з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота І.М. Ситник є фрагментом держбюджетної фундаментальної науково-дослідної теми Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України «Вивчити механізми розвитку кардіоміопатії при цукровому діабеті 1 типу та оптимізувати схему фармакологічної корекції» (номер державної реєстрації 0115U000913), в якій авторка є співвиконавцем.

Основний зміст дисертації та його оцінка. Дисертацію побудовано відповідно до вимог Наказу №40 МОН України від 12.01.2017. Вона складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, розділу «Аналіз і узагальнення результатів», висновків, списку використаних джерел, який містить 240 найменувань (з них 60 – кирилицею, 180 – латиницею, переважають роботи останніх років), додатків. Обсяг основного тексту дисертації становить 163 сторінки. Роботу ілюструють 18 таблиць та 45 рисунків. Автореферат за змістом повністю відповідає дисертації.

Дисертаційна робота починається з анотації, яка оформлена згідно з вимогами наказу №40 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій».

У **вступі** (7 сторінок) дисертантка обґрунтовує вибір теми, наводить зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, мету та 5 завдань

дослідження, які відповідають темі роботи, об'єкт і предмет дослідження в адекватних категоріальних формах, характеризує використані методи, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок, наводить дані щодо апробації матеріалів дисертації, публікацій за темою роботи, структури та обсягу роботи.

Мета роботи сформульована чітко та є теоретично обґрунтованою. Завдання, які вирішуються для досягнення мети, є конкретними.

В огляді літератури (21 сторінка) автором надано порівняльну характеристику механізмів розвитку кардіальних порушень при ЦД обох типів, висвітлено основні патогенетичні шляхи та роль ОС в розвитку кардіоміопатій при ЦД 1 типу, наведена фармакологічна характеристика антиоксидантів і їх роль у комплексній терапії та попередженні кардіальних порушень ЦД, описано напрямки фармакологічної корекції ДК та охарактеризовано роль інгібіторів реїн-ангіотензин-альдостеронової системи в їх терапії та попередженні, науково обґрунтовано вибір лозартану та антиоксиданта с кардіопротекторними властивостями N-ацетилцистеїну для експериментального вивчення їх комбінованого застосування з метою оптимізації профілактики та лікування серцево-судинних ускладнень при ЦД 1 типу. Огляд написано в аналітичному стилі.

Розділ «Матеріали і методи дослідження» (10 сторінок) містить інформацію про об'єкти дослідження, експериментальних тварин, висновки комісії з біоетики НМУ імені О.О. Богомольця (протоколи № 90 від 07.10.2015 та №117 від 21.12.2018), про алгоритм дослідження та обґрунтування вибору доз.

Скринінгові порівняльні дослідження антиоксидантної активності обраних препаратів проведено *in vitro* за модифікованою авторкою методикою - ступенем інгібування супероксидного радикалу. Також розраховано квантово-хімічні параметри їх молекулярних структур *in silico* із використанням напівемпіричного методу – гамільтоніану РМ3. Наведено докладну характеристику моделі стрептозотоцинового ЦД 1 типу, макроскопічних, біохімічних, морфологічних, токсикологічних, фізико-хімічних, цитологічних методів дослідження. У цілому методи є адекватними меті роботи.

Розділ 3 власних досліджень (11 сторінок) присвячено скринінговим дослідженням антиоксидантної активності обраних об'єктів. Дисертантом проведений порівняльний аналіз антиоксидантних властивостей двох антиоксидантів (N-ацетилцистеїну та тіотриазоліну) та двох антагоністів ангіотензинових рецепторів (лозартану та валсартану) *in vitro*, визначено, що лідерами за антиоксидантною активністю є N-ацетилцистеїн (79,1%) та лозартан (25,1%). Для підтвердження отриманих результатів автором було застосовано квантово-хімічні комп'ютерні методи, які дозволили визначити механізми взаємодії антиоксидантів та вільних радикалів, антиоксидантні властивості різних класів сполук на основі прогнозування кількісного співвідношення структура-активність *in silico*. Авторкою встановлено, що антиоксидантні властивості лозартану пов'язані із локалізацією енергії НОМО гідроксиметильного бічного ланцюга, антиоксидантні властивості N-ацетилцистеїну - із невисоким значенням дипольного моменту та локалізації енергії НОМО на сульфгідрильній групі. Дані препарати обрано для подальших поглиблених досліджень.

У **розділі 4** (54 сторінки) автор викладає результати порівняльного дослідження впливу N-ацетилцистеїну та лозартану на масу тіла, вуглеводний, енергетичний обмін та серцево-судинну систему (за показниками електрокардіограми) у щурів на моделі стрептозотоцинового ЦД 1 типу та описує результати поглибленого вивчення механізмів кардіопротекторної дії обраних препаратів на моделі стрептозотоцинового ЦД..

За результатами проведених досліджень визначено, що обидва досліджувані препарати достовірно знижували рівень глюкози крові експериментальних тварин. Для підтвердження антигіперглікемічної дії досліджуваних лікарських засобів на 5 тижні експерименту було проведено оральний глюкозо-толерантний тест у щурів. Встановлено, що за вираженістю антигіперглікемічної дії N-ацетилцистеїн вірогідно перевершував лозартан в 1,7 разу.

У цьому розділі за результатами електрокардіограми визначено, що як N-ацетилцистеїн, так і лозартан в умовах модельного ЦД ефективно відновлювали серцевий ритм, AV провідність, шлуночкову скоротливу активність, тобто ви-

явили кардіопротекторну дію. Найбільш виражені відновлення шлуночкової деполяризації та реполяризації зафіксовані у групі тварин, які отримували лозартан. N-ацетилцистеїн виявився більш ефективним у відновленні серцевого ритму та зменшенні проявів гіпертрофії.

Авторкою встановлено також позитивну дію досліджуваних препаратів на вміст глікозильованого гемоглобіну та маркери окисного пошкодження міокарда, як-от, активність лактатдегідрогенази, креатинкінази (КФК) та КФК-МВ, цитолітичних ферментів АлАт, АсАТ в сироватці крові експериментальних тварин. Лозартан вірогідно перевершував N-ацетилцистеїн за нормалізувальним впливом на активність КФК в 1,3 разу, на активність АлАТ – в 1,6 разу. При дослідженні інтегральних показників встановлено зменшення летальності тварин у групах лікованих тварин на 30-35% та достовірне відновлення їх маси тіла.

Дисертантка визначила, що застосування N-ацетилцистеїну в дозі 1500 мг/кг/добу та лозартану в дозі 20 мг/кг/добу протягом 4-х тижнів знижувало рівні генерування супероксидного радикалу в 1,8-2,0 рази, підвищувало рівень NO в тканині аорти в 1,4 разу, знижувало генерацію вільних радикалів в тканині печінки в середньому у 2,0 разу, що свідчить про їх метаболітотропні властивості. Визначено, що лозартан більш ефективно, ніж N-ацетилцистеїн, збільшував вміст насичених жирних кислот в тканинах міокарду та еритроцитах у 2,7 разу. N-ацетилцистеїн сприяв зростанню вмісту стеаринової кислоти, що свідчить про мембранопротекторну дію. Авторкою встановлено, що обидва препарати знижували процеси ліпопероксидації та активували ендогенну систему антиоксидантного захисту в міокарді. Лозартан сприяв більш активній утилізації супероксиду у сироватці крові, а N-ацетилцистеїн краще нейтралізував перексид водню. Лозартан вірогідно поступався N-ацетилцистеїну за впливом на процеси ліпопероксидації в тканині печінки. Застосування N-ацетилцистеїну сприяло підвищенню активності желатиназ 2 та 9 типу, що свідчить про гальмування розвитку фіброзу міокарда. Зниження експресії білку MMP-2 у тканині міокарда щурів, які отримували N-ацетилцистеїн, вказує на пригнічення проце-

сів ремоделювання міокарда. Дані біохімічних досліджень підтверджено результатами електронно-мікроскопічних досліджень.

Розділ 5 (25 сторінок) присвячено вивченню сумісного застосування N-ацетилцистеїну та лозартану на моделі стрептозотоцинового ЦД у щурів. Авторкою було досліджено дві комбінації досліджуваних препаратів для вибору найбільш оптимальних доз компонентів. Визначено, що найбільш виражену кардіопротекторну та антиоксидантну дію спричинила комбінація N-ацетилцистеїну в дозі 750 мг/кг та лозартану в дозі 2 мг/кг, а саме, виявила виражену антигіперглікемічну та антиоксидантну дію, сприяла нормалізації серцевого ритму, відновленню процесів деполяризації та реполяризації шлуночків, нормалізувала масу тіла, зменшувала масовий коефіцієнт міокарду, протидіяла екстрацелюлярній деградації матриксу та ремоделюванню міокарда, зменшуючи міокардальну експресію MMP-2 на 33%, покращувала мікроциркуляторне русло, посилювала енергетичне забезпечення та скоротливу функцію кардіоміоцитів, стимулювала регенеративні та трофічні процеси у міокарді дослідних тварин. Дані біохімічних досліджень підтверджено результатами електронно-мікроскопічних досліджень.

Розділ «**Аналіз та узагальнення результатів**» (18 сторінок) містить стислий підсумок сучасних уявлень про сучасні напрямки попередження та терапії ДК на тлі ЦД 1 типу, відповідне обговорення результатів власного дослідження у зіставленні з даними наукової літератури. Обговорення результатів проведене глибоко та всебічно. Отримані результати доводять доцільність застосування N-ацетилцистеїну та лозартану та їх комбінації для попередження та лікування ранніх кардіальних ускладнень при ЦД 1 типу.

Висновки, кількість яких становить 6, відповідають завданням дослідження, адекватно віддзеркалюють та узагальнюють отримані результати.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях достатня. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, які повністю відображають отримані результати (6 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, з них 3 – у виданнях, які включені до міжнародних нау-

кометричних баз, 6 тез доповідей, 1 інформаційний лист про нововведення у сфері охорони здоров'я).

Наукова новизна роботи полягає в експериментальному обґрунтуванню доцільності застосування N-ацетилцистеїну та лозартану, а також їх комбінації для фармакокорекції кардіальних порушень при ЦД 1 типу. Отримано нові дані щодо кардіопротекторної дії N-ацетилцистеїну та лозартану на тлі експериментального ЦД. З'ясовано, що N-ацетилцистеїн та лозартан ефективно запобігають деструктивним процесам у міокарді на тлі експериментального ЦД 1 типу. Кардіопротекторна дія N-ацетилцистеїну переважно досягається відновленням серцевого ритму, гальмуванням розвитку гіпертрофії лівого шлуночку, пригніченням кардіодеструктивних процесів та цитолізу, посиленням енергетичного забезпечення (покращення стану мітохондрій) та скоротливої функції міокардіоцитів. Лозартан виявляє кардіопротективний вплив переважно за рахунок відновлення шлуночкової скоротливої активності, зменшення кардіодеструктивних процесів. Окрім кардіопротективної дії, доведено антигіперглікемічний ефект N-ацетилцистеїну при стрептозотоциновому ЦД 1 типу. Поглиблено знання щодо молекулярних механізмів кардіопротекторної дії N-ацетилцистеїну та лозартану. Встановлено, що N-ацетилцистеїн та лозартан проявляють антиоксидантну дію, яка здійснюється за рахунок наростання рівня ненасичених жирних кислот (підвищення вмісту лінолевої кислоти в 2,5 разу та ліноленової у 2,3 разу) та зниження вмісту арахідонової кислоти в 1,4 разу, що свідчить про зменшення активності ліпопероксидації (зменшення вмісту ТБК-АП в 2,2 рази) та підвищення системи ендогенного антиоксидантного захисту тканин міокарда (підвищення рівня відновленого глутатіону в 2,5 разу, активності СОД - в 1,6 та 1,7 разу відповідно). Доведено, що кардіопротекторний ефект досягається впливом на активність матриксних металопротеїназ, що запобігає процесам ремоделювання в міокарді. Антипроліферативна дія N-ацетилцистеїну здійснюється зменшенням експресії білка MMP-2 на 20% та підвищенням активності MMP-2 та MMP-9 в 1,4 та 1,6 разів відповідно. Лозартан виявляє антипроліферативні властивості, збільшуючи активність MMP-9 в 1,5 разу. Доповнено нові

дані щодо мембраностабілізуючого ефекту N-ацетилцистеїну, який досягається переважно за рахунок збільшення вмісту стеаринової кислоти в 1,3 разу, а лозартану – за рахунок міnorних насичених жирних кислот (міристинової, пентадеканової, гептадеканової) у 2,7 разу. За результатами електронно-мікроскопічного дослідження встановлено вплив N-ацетилцистеїну на активацію аутофагії у кардіоміоцитах щурів, що проявлявся підвищеною кількістю аутофагосом, з чим може бути пов'язаний його кардіопротекторний ефект. Розширено уявлення щодо антиоксидантної активності N-ацетилцистеїну та лозартану шляхом квантово-механічного підходу. Отримано нові дані, які обґрунтовують доцільність сумісного застосування N-ацетилцистеїну (750 мг/кг/добу) та лозартану (2 мг/кг/добу). Сумісне застосування N-ацетилцистеїну та лозартану за умов кардіальних порушень ЦД 1 сприяє кращій виживаності тварин (95%), нормалізації серцевого ритму, відновленню скорочувальної здатності шлуночків (скорочення QTc 20,2% по відношенню до контрольної патології) за рахунок корекції окисного балансу (зменшення вмісту ТБК-АП на 52%, підвищення активності СОД на 60% та рівня ГЛТ), покращує глікемічний контроль (зменшення HbA1C на 30%), енергетичні процеси у кардіоміоцитах (зниження активності КФК-МВ в 1,8 разу) та гальмує процеси гіпертрофії та фіброзу міокарда, покращує регенеративні і трофічні процеси кардіоміоцитів.

Теоретичне значення результатів дослідження зумовлено тим, що доведено перспективність комбінованого застосування N-ацетилцистеїну та лозартану для профілактики та лікування ДК на ранніх стадіях ЦД 1 типу для попередження розвитку гіпертрофії міокарду і, як наслідку, діастолічної дисфункції, зменшення ризику спонтанної зупинки серця.

Дисертантом уточнено квантово-хімічні дескриптори антиоксидантної активності молекули N-ацетилцистеїну (енергія НОМО, -9,628 eV; дипольний момент μ , 2,663 дебай), виявлено фармакофорну групу молекули лозартану (гідроксиметильний ланцюг імідазольного кільця) та дескриптори антиоксидантної активності (енергія НОМО, -8,854 eV; IP, -8,854 eV; жорсткість η , 4,06 eV).

Практичне значення дисертаційного дослідження визначається тим, що за результатами дисертаційної роботи експериментально обґрунтовано доцільність застосування N-ацетилцистеїну і лозартану та їх комбінації у попередженні та лікуванні кардіальних порушень при ЦД 1 типу. Запропоновано метод доклінічної оцінки ефективності кардіопротекторних властивостей фармакологічних засобів за ранніми проявами діабетичної кардіоміопатії на підставі даних ЕКГ (інформаційний лист МОЗ України № 233-2017, 2017 р.).

Результати дисертації впроваджено в науково-педагогічний процес 2 закладів вищої освіти України: Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», у науково-дослідну роботу НДІ експериментальної та клінічної фармакології НМУ імені О.О. Богомольця та лабораторії промислової токсикології і гігієни праці при використанні хімічних речовин ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Обсяг роботи за кількістю тварин (234 щури) є достатнім, що в сукупності з адекватними методами дослідження та кваліфікованим аналізом результатів дозволяє вважати наукові положення обґрунтованими. У роботі застосовані сучасні статистичні методи аналізу з використанням ліцензійної програми, що дозволило правильно інтерпретувати експериментальні дані і зробити обґрунтовані висновки. Ступінь достовірності не викликає сумнівів. Таблиці та рисунки, наведені в дисертаційній роботі, доповнюють її основний зміст. Висновки роботи логічно випливають з результатів дослідження і повністю відповідають меті та завданням дослідження. Робота написана науково-літературною мовою, добре оформлена, список джерел літератури містить переважно сучасні джерела, 75% джерел - латиницею.

Недоліки та зауваження. Принципові недоліки дисертаційної роботи відсутні. Низка зауважень, що їх висловлено нижче, має характер рекомендацій.

У першому розділі, що його присвячено огляду літератури, доцільно було б більш уваги приділити саме характеристиці обраних для дослідження препа-

ратів. У другому розділі бажано б було додати більш розширене обґрунтування обраних доз досліджуваних препаратів. У розділах власних досліджень авторка наводить результати досліджень часто у вигляді рисунків та діаграм, а конкретні значення показників надає далі по тексту. На мій погляд, це не дуже зручно та ускладнює розуміння результатів проведених експериментів. Наявні невіправлені мовні (технічні) помилки.

Виникли такі запитання до І.М. Ситник:

1. Ваші препарати вірогідно збільшують активність металопротеїназ. Про що свідчать отримані результати?
2. Отримані Вами результати свідчать про збільшення маркеру оксидативного пошкодження ДНК - екскреції 8-оксогуаніну з сечею. Чим Ви можете це пояснити?
3. Чи можете Ви сказати, як конкретні переваги за кардіопротекторною та антиоксидантною дією має обрана комбінація порівняно із застосуванням кожного з окремих препаратів?

Ці зауваження і запитання не зменшують позитивну оцінку дисертації І.М. Ситник, в якій наведено важливі для фармакології результати, а висновки відповідають завданням дослідження та ґрунтуються на об'єктивних даних, що їх піддано ретельному аналізу.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації у практиці. Комбіноване застосування лозартану та N-ацетилцистеїну дозволить оптимізувати терапію кардіальних порушень при інсулінзалежному ЦД. Матеріали можуть бути використані для доклінічного вивчення кардіопротекторних властивостей лікарських засобів за ранніми проявами ДК на тлі ЦД 1 типу.

ВИСНОВОК

Дисертація І.М. Ситник «Фармакологічне обґрунтування застосування N-ацетилцистеїну та лозартану при кардіальних порушеннях цукрового діабету 1 типу» на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, 22 – охорона здоров'я є закінченою, само-

стійною кваліфікаційною науково-дослідною роботою. Її присвячено актуальній проблемі – оптимізації терапії кардіальних порушень ЦД 1 типу. З урахуванням високої актуальності теми, сучасного методичного рівня роботи, достатнього об'єму досліджень і використання адекватних експериментальних моделей та методів дослідження, коректної статистичної обробки результатів, що в сукупності дозволило авторці зробити об'єктивні висновки, а також наукової новизни, практичної значущості основних положень та висновків, дисертаційна робота «Фармакологічне обґрунтування застосування N-ацетилцистеїну та лозартану при кардіальних порушеннях цукрового діабету 1 типу» за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, 22 – охорона здоров'я відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, а Ситник Інна Миколаївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук.

Офіційний опонент,

професор кафедри фармакології

Національного фармацевтичного університету МОЗ України,

доктор фармацевтичних наук, професор

К.Г. Щокіна

Підпис професора К.Г. Щокіної засвідчую

Начальник відділу кадрів



З.Ф. Подстрелова

