

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Комісаренка Миколи Андрійовича
**«Фітохімічне вивчення листя брусниці звичайної та створення на їх
основі нових лікарських засобів»,**
представлену до спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при
Національному фармацевтичному університеті на здобуття наукового
ступеня кандидата фармацевтичних наук
за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки. Одним із важливих і пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної науки є пошук і отримання нових біологічно активних субстанцій рослинного походження з метою розробки ефективних лікарських засобів. Достатньо перспективним напрямком у цьому плані є дослідження вітчизняних офіцинальних лікарських рослин, які мають забезпечену сировинну базу і широко використовуються у сучасній терапії багатьох захворювань. Ще одним актуальним напрямком досліджень є опрацювання нових критеріїв і їх числових параметрів стандартизації сировинних органів лікарських рослин, які б відповідали вимогам Державної Фармакопеї України (ДФУ). Саме до таких рослин відноситься брусниця звичайна, листя якої здавна і успішно використовують в офіційній і народній медицині, в першу чергу для лікування інфекційно-запальних захворювань сечовидільної системи.

Тому тема дисертаційної роботи Комісаренка М. А., яка передбачає фітохімічне вивчення листя брусниці звичайної в плані отримання на основі цієї сировини нових біологічно активних субстанцій, дослідження їх фармакологічної активності, розробку методик і сучасних критеріїв їх стандартизації є достатньо актуальною і важливою та спрямована на вирішення пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної науки.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне

дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність. Мета дисертаційної роботи достатньо обґрунтована і базується на наявних теоретичних і практичних проблемах, що мають місце в фармацевтичній науці. Мета чітко сформульована, а поставлені в роботі задачі витікають із мети і слугують інструментом для її досягнення. Дослідження, виконані дисертантом, у методичному плані відповідають достатньому науково-теоретичному рівневі, глибокі за опрацюванням і забезпечують базу для розробки нових підходів щодо їх практичного використання.

Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі є достатньо обґрунтованими і достовірними. Це забезпечується використанням сучасних методів аналізу хімічного складу рослинних об'єктів дослідження, математичним підтвердженням достовірності та коректності отриманих результатів, отриманням патенту України на винахід за результатами експериментальних досліджень, апробацією та впровадженням результатів дисертаційної роботи у виробничий процес ряду фармацевтичних підприємств України та навчальний процес і наукову роботу кількох медичних (фармацевтичних) ВНЗ МОЗ України.

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі наведено результати проведеного вперше системного фітохімічного вивчення листя брусниці звичайної, за результатами якого встановлено якісний склад та кількісний вміст основних БАР (прості феноли, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, кумарини, органічні кислоти, амінокислоти, макро- та мікроелементи).

За допомогою ПХ, ТШХ та ВЕРХ у досліджуваній сировині брусниці звичайної було ідентифіковано прості феноли: гідрохінон та арбутин; кумарин та його похідні: умбеліферон та скополетин; фенолкарбонів та

гідроксикоричні: галова, елагова, *n*-кумарова, кофейна, розмаринова, хлорогенова кислоти; 5 катехинів, флавоноїди: кверцетин, гіперозид, рутин, кемпферол-3-О-глюкозид та апігенін; 51 речовину легкої фракції; 32 карбонові кислоти; 15 амінокислот; 12 макро- та мікроелементів.

Результати фітохімічного дослідження підтвердили перспективність використання листя брусниці звичайної як джерела БАР для отримання нових біологічно активних субстанцій на їх основі.

З метою опрацювання нових критеріїв стандартизації листя брусниці автором дисертаційної роботи вперше проведено порівняльний аналіз показників доброякісності листя брусниці за ДФ XI, ДФ Республіки Білорусь та вимогами ДФУ до ЛРС. Дисертантом підтверджено можливість використання спектрофотометричної методики монографії «Мучниці листя» ДФУ для визначення кількісного вмісту гідрохінонпохідних у листі брусниці, а також розроблено методику ідентифікації ЛРС рослини з використанням ТШХ (речовини порівняння арбутин та галова кислота). На основі проведених досліджень визначено кількісний критерій якості листя брусниці за вмістом гідрохінонпохідних на рівні не менше 3,5 %.

Дисертантом вперше розроблено проект національної монографії ДФУ «Брусниці листя^N», а також проведено стандартизацію 6 серій сировини відповідно до встановлених вимог.

В плані отримання нових біологічно активних субстанцій із листя брусниці звичайної дисертантом вперше розроблені технологічні параметри одержання густого екстракту із листя рослини, встановлено, що оптимальним екстрагентом для вилучення фенольних речовин є 50% етиловий спирт (за виходом екстрактів та вмістом фенольних речовин у них).

Як завершальний етап роботи дисертантом розроблено схеми одержання із листя рослини густого екстракту «Арбувіт» та модифікованого на його основі екстракту «Флавітат», на які отримано патент України на винахід.

З метою стандартизації отриманих густих екстрактів проведено

вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних груп БАР у них, виявлено 12 речовин фенольної природи, домінантними сполуками виявились арбутин, епікатехін та рутин, 32 карбонові кислоти 15 амінокислот, 12 макро- та мікроелементів, визначено кількісний вміст гідрохінонпохідних, суми гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та фенольних сполук.

На перспективність подальших досліджень екстрактів «Арбувіт» та «Флавітар» вказує доведення автором дисертаційної роботи їх значної гіпоглікемічної, гіполіпідемічної, антимікробної, діуретичної та протизапальної активності, а також розробка проектів МКЯ на зазначені біологічно активні субстанції. Ним вперше встановлено, що внесення амінокислоти аргініну в екстракт з листя брусниці звичайної посилює його гіпоглікемічну та гіполіпідемічну активність.

Теоретичне значення результатів дослідження. Робота має теоретичне значення у області фармакогнозії та фармацевтичної хімії. Автором вперше проведено теоретичне узагальнення та вирішення наукової задачі, що виявилась у системному дослідженні сировинних органів листя брусниці звичайної, отриманні нових біологічно активних субстанцій на його основі, визначенні їх фармакологічної активності, розробці сучасних методик стандартизації рослинної сировини та отриманих субстанцій.

В ході проведених досліджень автором запропоновані нові критерії та параметри доброякісності листя брусниці звичайної та густих екстрактів на його основі, які можуть бути використані при проведенні заготівлі рослинної сировини, вхідному контролі в умовах промислового виробництва, а також проведено нормування числових показників доброякісності і кількісне визначення діючих речовин за сумою гідрохінонпохідних (листя брусниці) та флавоноїдів (густий екстракт).

Результати фармакологічних досліджень автора дозволили обґрунтувати можливість практичного використання густих екстрактів листя брусниці у якості субстанцій для отримання нових лікарських засобів, в

першу чергу гіпоглікемічної та гіполіпідемічної дії.

Практичне значення одержаних результатів. На значне практичне значення дисертаційної роботи вказує розробка автором проекту національної монографії ДФУ «Брусниці листя^N», яке було проведено спільно з ДП «Український фармакопейний центр якості лікарських засобів», а також опрацювання способів та технологічних параметрів одержання нових біологічно активних субстанцій з листя брусниці звичайної (густі екстракти «Арбувіт» та «Флавітар»), які були апробовані у виробничих умовах ТзОВ «КФК «Грін фарм Косметик».

Як завершальний етап досліджень щодо стандартиції та впровадження нових субстанцій дисертантом розроблені два проекти МКЯ на екстракти густі «Арбувіт» та «Флавітар», а також передано технологічну документацію на них для подальшої фармацевтичної розробки і промислового виробництва.

Результати дисертаційних досліджень Комісаренка М. А. використовуються в навчальному процесі та науково-дослідній роботі профільних кафедр кількох провідних ВНЗ медичного (фармацевтичного) профілю МОЗ України, про що свідчать відповідні акти впровадження.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті, а також їх апробація. Результати дисертаційної роботи в повній мірі викладені в наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, з них 7 у фахових виданнях України (5 статей у виданнях, які входять до наукометричних баз), 2 статті у виданнях іноземних держав, 6 тез доповідей, 1 патент України на винахід.

Основні положення дисертаційної роботи доповідались на 6 науково-практичних форумах і конференціях. Опубліковані роботи і автореферат повністю відповідають основним результатам досліджень.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації. Теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи свідчать про можливість розробки нових лікарських засобів на основі густих екстрактів листя брусниці, що дасть можливість розширити фармако-терапевтичний спектр

застосування цієї рослини в офіційній медицині за новими показами. Проведені автором дослідження щодо визначення нових критеріїв стандартизації та їх числових параметрів листя брусниці, густих екстрактів на його основі можуть бути використані при проведенні заготівель рослинної сировини, на фармацевтичних підприємствах при створенні нових лікарських засобів на основі БАР рослини.

Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому. Дисертаційна робота Комісаренка М. А. написана у традиційній формі, викладена на 222 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, трьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Робота ілюстрована 27 таблицями, 52 рисунками, бібліографія становить 154 найменування, з яких 59 іноземною мовою.

Вступ дисертаційної роботи включає дані щодо актуальності, мети роботи, наукової новизни і практичної значимості, особистого внеску здобувача, апробації результатів досліджень, її структури та обсягу. Мета дослідження автором сформульована чітко і має достатнє теоретичне обґрунтування.

Перший розділ (огляд літератури) присвячено основним аспектам ботанічної характеристики, особливостям поширення і культивування, стану сировинних ресурсів, хімічного складу, фармакологічної активності та сучасним аспектам застосування в медицині лікарських засобів на основі листя брусниці звичайної. Проведений аналіз літературних даних показав, що хімічний склад сировинних органів цього виду вивчено недостатньо, на вітчизняному ринку лікарські засоби на їх основі практично відсутні. Це створило передумови для більш поглибленого фітохімічного вивчення листя брусниці звичайної та визначення перспективи створення вітчизняних лікарських засобів на основі цього виду сировини.

У **другому розділі** автор дає коротку характеристику об'єктів та методів дослідження. Об'єктом дослідження було листя брусниці звичайної, заготовлене у Львівській та Івано-Франківській областях, а також фасована сировина, придбана в аптечній мережі. У роботі було використано традиційні та нові сучасні фізичні, фізико-хімічні та хімічні методи аналізу, достовірність отриманих результатів підтверджена статистично.

Третій розділ присвячений вивченню якісного складу та кількісного вмісту основних груп БАР в листках брусниці звичайної та розробці критеріїв їх стандартизації.

В результаті проведеного фітохімічного аналізу листя брусниці звичайної (методи ПХ, ТШХ, ВЕРХ, СФ) були виявлені фенологікозид арбутин, кумарини: умбеліферон, скополетин, кумарин; фенолкарбонові та гідроксикоричні кислоти: галова, елагова, кофейна, розмаринова, п-кумарова, хлорогенова; 5 катехинів та 5 флавоноїдів: кверцетин, гіперозид, рутин, кемпферол-3-О-глюкозид та апігенін, 21 терпеноїд, 32 карбонові кислоти, 16 амінокислот (переважають метіонін, лейцин, ізолейцин, валін, лізин), 12 макро- та мікроелементів (домінують калій, кальцій, кремній та магній).

Важливим аспектом цього розділу були дослідження спрямовані на опрацювання нових критеріїв та числових показників доброякісності листя брусниці в плані стандартизації цього виду ЛРС за вимогами ДФУ. Для цього автором був проведений порівняльний аналіз показників доброякісності листя брусниці за наявною нормативно-технічною документацією: монографії ДФ XI та ДФ Республіки Білорусь. Після проведення комплексних експериментальних досліджень сировини дисертантом підтверджена можливість і запропоновано використання спектрофотометричної методики, наведеної в монографії «Мучниці листя» ДФУ, для кількісно визначення вмісту гідрохінонпохідних листя брусниці.

Опрацювання зазначеної методики на серійних зразках сировини дозволило визначити фармакопейний кількісний критерії якості листя

брусниці за вмістом гідрокінонпохідних на рівні не менше 3,5 % у перерахунку на арбутин.

У цьому ж розділі в плані розробки фармакопейних критеріїв ідентифікації листя брусниці автором визначені анатомічні діагностичні ознаки спорошкованої сировини цієї рослини.

Для хроматографічної ідентифікації листя брусниці дисертантом запропоновано використання хроматографії в тонкому шарі силікагелю (система розчинників: кислота мурашина – вода – етилацетат (6:6:88), речовини порівняння арбутин та галова кислота, проявники – розчини амінопіразолону, калію фериціаніду та пари амонію).

В завершальній частині цього розділу автор наводить розроблений ним проект національної монографії ДФУ «Брусниці листя^N», а також результати аналізу шести серійних зразків листя рослини на відповідність числовим показникам доброякісності сировини, які наведені у зазначеній монографії.

В **четвертому розділі** наведені результати опрацювання технологічних параметрів отримання нових біологічно активних субстанцій листя брусниці у вигляді густих екстрактів, дослідження якісного складу та кількісного вмісту їх основних БАР, визначення їх токсичності та основних видів фармакологічної активності.

За результатами дослідження здійснено вибір оптимального екстрагенту для вилучення БАР з листя брусниці звичайної за такими критеріями, як вихід екстрактів, вміст у них гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, фенольних сполук та гідрокінонпохідних. Встановлено, що 50 % спирт етиловий є оптимальним екстрагентом для одержання нових біологічно активних субстанцій (густі екстракти) на основі фенольних сполук листя брусниці звичайної.

Для підтвердження вибору оптимального екстрагенту автором проведено також вивчення діуретичної, протизапальної та антимікробної активності одержаних екстрактів. У результаті дослідження діуретичної активності встановлено, що найбільшу активність виявляє екстракт,

одержаний 50 % етанолом, який у дозі 50 мг/кг збільшує діурез на 57 %, що всього на 16 % менше за активність препарату порівняння «Гіпотіазид» у дозі 25 мг/кг.

Найбільшу антибактеріальну дію по відношенню до грам негативних мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, які є найчастішими збудниками інфекцій сечовивідних шляхів, виявляє екстракт, одержаний також 50 % етиловим спиртом, що має більш широкий спектр і вищий ступінь активності у порівнянні з екстрактами, отриманими водою очищеною та 96 % етиловим спиртом.

У результаті дослідження протизапальної активності екстрактів із листя брусниці звичайної встановлено, що найбільшу активність виявляють екстракти у дозах 25 мг/кг, одержані 50 % етиловим спиртом та водою очищеною, у порівнянні з активністю референс-препарату «Диклофенак натрію» – у дозі 8 мг/кг.

У цьому ж розділі наведено розроблені автором технологічні схеми одержання з листя брусниці звичайної екстракту густого «Арбувіт» та модифікованого на його основі екстракту «Флавітар», спосіб одержання яких захищено патентом України на винахід.

З метою стандартизації отриманих екстрактів «Арбувіт» та «Флавітар» автором дисертаційної роботи проведено детальне вивчення їх хімічного складу. В екстракті «Арбувіт» виявлено 12 речовин фенольної природи, домінантними виявились арбутин, епікатехін та рутин; 15 амінокислот, 6 з яких є незамінні; 32 карбонові кислоти (домінантними сполуками є ліноленова, лінолева, олеїнова, стеаринова, лимонна, п-кумарова та левулінова кислоти); визначено 12 елементів, домінантними з яких є калій, кальцій та силіцій, вміст важких металів не перевищує гігієнічних норм.

У 4 серіях екстрактів «Арбувіт» та «Флавітар» спектрофотометричним методом визначено вміст основних груп БАР : гідрохінонпохідних – 7,26 %–8,30% та 4,54%–4,94%; гідроксикоричних кислот – 2,10%–2,21% та 1,30%–1,39%; флавоноїдів – 3,11%–3,94% та 2,01%–2,39%; суми фенольних сполук

– 20,09%–21,11% та 12,03%–13,11% відповідно.

Як завершальний етап цього розділу, автор наводить результати досліджень щодо визначення фармакологічної активності отриманих екстрактів. Зокрема визначено різні види фармакологічної активності екстракту «Арбувіт», а саме: антимікробну по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris* та *Pseudomonas aeruginosa*; діуретичну, яка на 57 % вища у порівнянні з контрольною групою; протизапальну та антиексудативну на рівні 98 % по відношенню до контролю. Достатньо важливим є наявність гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності екстрактів «Арбувіт» і «Флавітар», зокрема вищу активність виявляє екстракт «Флавітар».

У результаті дослідження токсичності екстрактів встановлено, що екстракти «Арбувіт» та «Флавітар» належать до IV класу токсичності за класифікацією К. К. Сидорова.

П'ятий розділ присвячений питанням стандартизації густих екстрактів листя брусниці звичайної, зокрема наводяться результати досліджень щодо розробки проектів МКЯ на екстракти «Арбувіт» та «Флавітар», які було апробовано в лабораторних умовах ТзОВ «КФК» Грін фарм Косметик» для визначення доброякісності отриманих на промисловому обладнанні кількох серій зазначених екстрактів.

У проекті МКЯ на густий екстракт «Арбувіт» як основний показник доброякісності запропоновано кількісний вміст гідрохінонпохідних (у досліджуваних серіях екстрактів знаходився в межах 7,3 %-8,3 %), а у проекті МКЯ на екстракт «Флавітар» – кількісний вміст флавоноїдів (у досліджуваних серіях екстрактів знаходився в межах 2,1%-2,3 %).

Зауваження і пропозиції.

Дисертаційна робота Комісаренка М. А, вирізняється значним за обсягом експериментальним фактичним матеріалом, оригінальними сучасними підходами до вирішення поставлених завдань. Висновки автора базуються на фактичному матеріалі, достовірність отриманих результатів не

викликає сумніву.

Однак, поряд з позитивними характеристиками, при рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі зауваження і пропозиції:

1. У роботі наведено результати вивчення макро- та мікроелементів листя брусниці із різних місць заготівлі. Чи вивчався елементний склад ґрунтів місць проростання, оскільки без цього показника важко зробити висновок щодо концентрування рослиною певних макро- та мікроелементів?
2. Чи проводились дослідження з підготовки проекту нової «Інструкції щодо заготівлі та сушіння листя брусниці звичайної», особливо у відповідності з вимогами належної практики заготівлі і культивування лікарських рослин (GACP)?
3. В дисертації доведено значну гіпоглікемічну активність отриманих густих екстрактів, варто було б оцінити її не лише у порівнянні з контролем, але і з будь-яким лікарським рослинним засобом аналогічної дії, зареєстрованим в Україні.
4. В густому екстракті «Флавітар» проведено визначення кількох класів фенольних речовин. Чому саме за вмістом флавоноїдів пропонується стандартизація цієї нової біологічно активної субстанції?
5. Робота написана грамотно, легко читається, але іноді зустрічаються технічні помилки та невдалі вислови.

Проте, вказані недоліки є несуттєвими і не впливають на загальну цілком позитивну оцінку дисертації, не зменшують її наукового та практичного значення.

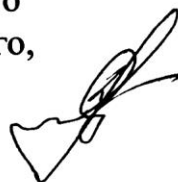
Відповідність дисертації вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів».

На підставі вищевикладеного можливо зробити висновок, що дисертаційна робота Комісаренка Миколи Андрійовича «Фітохімічне вивчення листя брусниці звичайної та створення на їх основі нових

лікарських засобів», є завершеною науковою працею і за обсягом виконаних досліджень, своєю актуальністю, ступенем обґрунтованості наукових положень, новизною одержаних результатів, теоретичним та практичним значенням повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами, а її автор Комісаренко Микола Андрійович заслуговує присвоєння йому наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри фармакогнозії і ботаніки
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
кандидат фармацевтичних наук



доц. Дармоgray Р. Є.

Підпис доц. Р. Є. Дармоgray
засвідчую: вчений секретар
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького



Ягело С. П.

