

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
 "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ
 ІМ. П. МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ
 АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"
 вул. Пушківська, 14-16,
 тел. +38057 731-31-51, факс +38057 731-34-61

Відгук офіційного опонента

доктора фармацевтичних наук, професора Мартинова Артура Вікторовича на дисертаційну роботу Прокопенко Юлії Сергіївни «Експериментально-теоретичне обґрунтування оптимізації пошуку рослинних протисудомних засобів», представлену до офіційного захисту у Спеціалізовану вчену раду Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми. Епілепсію вважають одним з найбільш тяжких хронічних захворювань центральної нервової системи. Застосування існуючих протисудомних засобів синтетичного походження не дозволяє досягти значного покращення стану пацієнтів, переважно за рахунок обмеженого впливу на окремі механізми розвитку судом. Як результат, до терапевтичних схем включають додаткові лікарські засоби, що збільшує ризик виникнення побічних ефектів та погіршення якості життя хворих. Ступінь поширеності епілепсії зумовлює необхідність пошуку ефективних методів терапії даного захворювання та використання профілактичних заходів.

Визначення перспектив застосування лікарської рослинної сировини для лікування епілепсії привертає увагу науковців завдяки комплексному впливу на етіологічні фактори, патогенетичні ланки та симптоматичні прояви захворювання, проте на сучасному світовому фармацевтичному ринку відсутні протисудомні засоби рослинного походження. Враховуючи це, пошук лікарської рослинної сировини з протисудомною дією, комплексне експериментальне вивчення її хімічного складу та розробка на лікарських засобів для лікування епілепсії представляє безперечний інтерес для сучасної фармацевтичної науки. Встановлення кореляційних взаємозв'язків дасть змогу виявити закономірності впливу різних груп біологічно активних сполук на реалізацію протисудомного ефекту, обґрунтувати шляхи оптимізації пошуку рослинних антиконвульсантів та у майбутньому оптимізувати фармакологічні дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темами «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (номер державної реєстрації 0103U000476) та «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було експериментальне обґрунтування оптимізації пошуку лікарської рослинної сировини з протисудомною дією серед представників флори України.

Мета роботи базується на наявних теоретичних та практичних проблемах у відповідній області, наведені в роботі завдання є чітко сформульованими. Для досягнення поставленої мети дисертантом розроблено алгоритм

цілеспрямованого пошуку перспективної лікарської рослинної сировини серед представників української флори для розробки оригінальних рослинних антиконвульсантів; в обраній лікарській рослинній сировині експериментально визначено вміст основних груп біологічно активних речовин, що мають найбільший протисудомний потенціал; з досліджуваної лікарської рослинної сировини одержано сухі екстракти з використанням екстрагентів різної природи; одержані екстракти піддано фармакологічному скринінгу, за результатами якого обрано об'єкти для поглибленого хімічного та фармакологічного вивчення; здійснено кореляційні дослідження щодо взаємозв'язку між вмістом основних біологічно активних речовин та їх впливом на реалізацію протисудомного ефекту; на підставі проведеного фітохімічного дослідження запропоновані параметри стандартизації екстрактів-лідерів; на основі здійснених експериментальних досліджень сформовані основні принципи цілеспрямованого пошуку рослинних антиконвульсантів; для розрахунку протисудомного потенціалу лікарської рослинної сировини розроблено оригінальне програмне забезпечення.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше здійснено теоретичне обґрунтування пошуку рослинних протисудомних засобів. Вперше експериментально підтверджено прийнятність запропонованого методологічного підходу до пошуку рослинних антиконвульсантів.

Вперше у рослинах родин барбарисові, березові, глухокропивні, гортензіїві, жимолостеві, маслинові, омелові, пасльонові, руткові, синюхові визначено вміст біологічно активних сполук, що впливають на роботу центральної нервової системи та можуть розглядатись як маркери протисудомної активності сировини: 4-гексенова та каприлова кислоти; амінокислоти флавоноїди; алкалоїди; поліфенольні сполуки; гідроксикоричні кислоти.

Вперше розроблено та оптимізовано методики визначення нейромедіаторних амінокислот та алкалоїдів у сировині методами ВЕРХ та абсорбційної спектрофотометрії. Вперше за результатами фармакологічного скринінгу сухих екстрактів та визначення їх хімічного складу здійснено комплексне кореляційне дослідження залежності протисудомної активності від вмісту основних груп біологічно активних речовин за допомогою QSAR-аналізу.

З метою опрацювання маркерів стандартизації сухого екстракту трави рутки Шлейхера за допомогою методу молекулярного докінгу вперше здійснено *in silico* вивчення протисудомного потенціалу біологічно активних речовин, що входять до його складу. Вперше дослідженням *in vivo* дисертантом встановлено вплив флавоноїдів, протеїн-полісахаридного комплексу, суми алкалоїдів та протопіну, що входять до складу сухого водного екстракту трави рутки Шлейхера, на реалізацію протисудомного ефекту.

Вперше здійснено апробацію портативного обладнання для контролю якості лікарської рослинної сировини. Вперше визначено критерії стандартизації сухого екстракту трави базиліку камфорного сорту Пурпурний.

Дисертантом вперше запропоновано алгоритм вибору лікарської рослинної сировини з протисудомним потенціалом. Вперше розроблено оригінальне програмне забезпечення для розрахунку ймовірного протисудомного потенціалу лікарської рослинної сировини.

Автором отримано 3 патенти на винаходи та 4 патенти на корисні моделі.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Результати дисертаційної роботи мають значний теоретичний інтерес, який полягає у створенні наукового підґрунтя для цілеспрямованого пошуку лікарської рослинної сировини та розробки оригінальних рослинних засобів з протисудомною дією. Для здійснення подальших досліджень у цьому напрямку є корисними закономірності «фактори хімічного складу – протисудомна дія», встановлені дисертантом.

Сухий екстракт базиліку камфорного сорту Пурпурний впроваджено у промислове виробництво на ТОВ «Дослідний завод ДНЦЛЗ» та наразі планується до впровадження у вигляді лікарського засобу після здійснення відповідних випробовувань.

Технологія одержання екстракту трави рутки Шлейхера та методики контролю його якості апробовані в промислових умовах на базі ТОВ «ДКП „Фармацевтична фабрика“», м. Житомир. Планом наукових досліджень на 2019-2020 р. підприємства передбачено фармацевтичну розробку лікарської форми на основі сухого екстракту трави рутки Шлейхера та доклінічні дослідження відповідно до вимог реєстраційного досьє.

Узагальнення практичних результатів досліджень впроваджено в галузі охорони здоров'я у вигляді 2 інформаційних листів МОЗ України.

Велике практичне значення має розроблене оригінальне програмне забезпечення «AntiConvulsant_Test» для розрахунку наявності протисудомної активності у зразках ЛРС в залежності від хімічного складу.

Результати, отримані при виконанні дисертаційного дослідження, впроваджені у науково-практичну діяльність кафедр закладів вищої освіти України.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті, а також їх апробація. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 53 наукові роботи, серед яких 25 статей у наукових фахових виданнях, у тому числі 7 – у зарубіжних фахових виданнях; 3 патенти на винахід; 4 патенти на корисну модель; 19 тез доповідей, 2 інформаційних листи. Опубліковані результати повністю відображають зміст дисертаційної роботи, а автореферат дисертації як за структурою, так і за змістом відповідає основним положенням роботи.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, 6 розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Основний зміст дисертаційної роботи викладено на 270 сторінках. Робота ілюстрована 20 таблицями, 98 рисунками. Список використаних джерел містить 459 найменувань.

Дисертаційна робота починається з анотації, оформленої згідно до вимог наказу «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій».

Вступ дисертаційної роботи включає дані стосовно обґрунтування вибору теми дослідження, мети та завдань дослідження, методів дослідження, наукової новизни, теоретичного та практичного значення отриманих результатів, особистого внеску здобувача, а також апробації результатів дослідження.

Розділ 1 (Огляд літератури) присвячений аналізу даних літературних першоджерел стосовно обраної тематики. Дисертант наводить характеристику епілепсії, тенденції захворюваності на епілепсію у світі, принципи її фармакотерапії, а також особливості застосування лікарської рослинної сировини для лікування епілепсії, що стало підґрунтям для вибору об'єктів дослідження.

У розділі 2 наведено дані щодо об'єктів дослідження, сформульовано алгоритм вибору перспективної для подальшого вивчення лікарської рослинної сировини, наведено загальний дизайн дослідження. Автором наведено методики, прилади та реактиви, які були використані при проведенні дисертаційного дослідження.

Розділ 3 присвячений визначенню вмісту біологічно активних сполук, які можуть впливати на реалізацію протисудомного потенціалу лікарської рослинної сировини. Методом ГРХ визначено вміст коротко ланцюжкових жирних кислот: 4-гексенової кислоти та каприлової кислоти та терпенових сполук (карвакрол, терпінеол, тимол, борнеол, спатуленол) у досліджуваній сировині. Методом ВЕРХ визначено вміст нейромедіаторних амінокислот у сировині (ГАМК, гліцин, гістидин, валін, аланін, триптофан), для чого розроблено оригінальну методику із застосуванням хроматографічної колонки НІІС. Методом ВЕТШХ ідентифіковано вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у лікарській рослинній сировині. Встановлено, що у досліджуваних зразках флавоноїди здебільшого представлені рутином, лютеоліном, гіперозидом та кверцитрином. Серед гідроксикоричних кислот були ідентифіковані хлорогенова, неохлорогенова, кофейна, fumarова та розмаринова кислоти. Кількісне визначення флавоноїдів здійснювали методом абсорбційної спектрофотометрії. Встановлено високий вміст флавоноїдів у листі садового жасмину звичайного (17,4 мг/г) та листі форзиції європейської (15,8 мг/г). Методом ВЕРХ визначено кількісний вміст гідроксикоричних кислот. У зразках трави базилику камфорного сортів Пурпурний та Генуезький та пагонах омели білої з гілок різних дерев встановлено наявність урсолової кислоти та визначено її кількісний вміст. Проаналізовано вміст алкалоїдів у рослинах родин руткові, пасльонові та барбарисові. Методом абсорбційної спектрофотометрії визначено кількісний вміст суми поліфенольних сполук у досліджуваній лікарській рослинній сировині.

У розділі 4 наведено результати фармакологічного скринінгу одержаних сухих водних, водно-спиртових, спиртових та ліпофільних екстрактів. Дисертантом визначено, що для водного екстракту трави рутки Шлейхера, водного екстракту трави базилику камфорного сорту Пурпурний, водного екстракту листя ліщини звичайної, водного екстракту трави собачої кропиви,

водного екстракту пагонів омели білої з гілок клену звичайного, водно-спиртового екстракту трави базилику камфорного сорту Генуезький, водно-спиртового екстракту пагонів омели білої з гілок клену звичайного, водно-спиртового екстракту трави перцю однорічного та водно-спиртового екстракту трави собачої кропиви встановлено наявність протисудомних властивостей. За результатами поглибленого вивчення протисудомної активності на моделях судом із різним патогенезом сухі водні екстракти трави рутки Шлейхера та базилику камфорного сорту Пурпурний обрано для поглибленого дослідження.

За допомогою PASS-прогнозування встановлено наявність протисудомної активності для біологічно активних речовин, що входять до складу екстрактів-лідерів. Дисертантом визначено вміст нейромедіаторних амінокислот, флавоноїдів, поліфенольних сполук, алкалоїдів у сухих екстрактах та виявлено якісний взаємозв'язок між вмістом біологічно активних сполук у сухих екстрактах та реалізацією протисудомної активності. Дисертантом здійснено визначення кількісних параметрів кореляції «вміст біологічно активних речовин – протисудомна активність». Встановлено, що показник тривалості судомного нападу достовірно корелює із вмістом амінокислот ($r=580$). Також встановлено значущу кореляцію тривалості латентного періоду із вмістом рутину ($r=614$).

У розділі 5 наведено результати поглибленого дослідження сухого екстракту трави базилику камфорного сорту Пурпурний, в результаті чого виявлено м'яку протисудомну активність екстракту та його здатність прискорювати реабілітацію після перенесеної черепно-мозкової травми, що підкреслює актуальність впровадження даного екстракту у фармацевтичне виробництво. В рамках проекту "Visiting Scientist" Фармакопеї США апробоване портативне обладнання для газової хроматографії, ІЧ-спектрометрії, рентген-флуориметрії для здійснення контролю якості трави базилику камфорного сортів Пурпурний та Генуезький. Визначені параметри стандартизації сухого екстракту у відповідності з вимогами ДФУ: опис, ідентифікація, втрата в масі при висушуванні, вміст важких металів, мікробіологічна чистота, кількісне визначення флавоноїдів та рутину.

У розділі 6 наведені результати поглибленого вивчення сухого екстракту трави рутки Шлейхера, в результаті чого доведено його проти епілептичну активність в умовах хронічного епілептогенезу, встановлено гостру токсичність та виявлено анксиолітичні властивості. Методом молекулярного докінгу здійснено визначення біологічно активних речовин, що чинять найбільший вплив на прояв протисудомної активності. Для експериментального визначення протисудомної активності біологічно активних речовин у складі сухого екстракту трави рутки Шлейхера з екстракту виділені флавоноїди, протеїн-полісахаридний комплекс, алкалоїди та протопін, які піддані фармакологічному випробуванню на моделі пентилентетразолових судом. Визначені параметри стандартизації сухого екстракту у відповідності з вимогами ДФУ: опис, ідентифікація, втрата в масі при висушуванні, вміст важких металів, мікробіологічна чистота, кількісне визначення алкалоїдів, флавоноїдів та рутину.

Розділ 6 присвячений формулюванню теоретичних закономірностей впливу хімічного складу лікарської рослинної сировини на реалізацію її протисудомної активності. Для оптимізації цілеспрямованого пошуку рослинних антиконвульсантів дисертантом представлено дерево рішень. Наведені результати з розробки програмного забезпечення «AntiConvulsant Test».

Особистий внесок здобувача. Усі наукові узагальнення, положення, обґрунтування, інтерпретація результатів, формування висновків та рекомендацій, викладених у дисертаційній роботі, виконані особисто автором. Співавторами дисертанта у наукових публікаціях є науковий консультант та науковці, що були залучені до виконання досліджень. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Зауваження і пропозиції. Результати роботи вірогідні, висновки зроблені на їх основі не викликають заперечень. Проте виникають питання та є ряд зауважень:

1. У розділі 6.4.1 представлено результати Прогнозування протисудомної активності індивідуальних рослинних субстанцій рутки Шлейхера з використанням молекулярного докінгу. Не зрозуміло, чому дисертантом обрано саме 1GNU як мішені. Крім того, відсутнє моделювання афінності 1GNU до вальпроєвої кислоти як контролю.

2. У розділі 4.2 було б доцільно наводити результати фармакологічного скринінгу одержаних сухих екстрактів у порівнянні з позитивним контролем (вальпроєвою кислотою).

3. Дисертантом обґрунтована необхідність визначення жирних кислот, терпенових сполук, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, поліфенольних сполук та алкалоїдів у лікарській рослинній сировині, проте в сухих екстрактах визначали вміст лише алкалоїдів, флавоноїдів та поліфенольних сполук.

4. На рисунках деяких хроматограм слід збільшити розмір шрифту для більш комфортного сприйняття інформації.

5. По тексту дисертації зустрічаються поодинокі орфографічні помилки та невдалі вирази.

6. У якості побажання хотілося б звернути увагу автора на сухий екстракт листя ліщини звичайної, який за рівнем протисудомної активності не поступається екстрактам-лідерам, тому може бути перспективним для подальших досліджень.


Наведені питання, зауваження та побажання мають в основному дискусійний характер і не впливають на основні положення та висновки, наведені в роботі.

Відповідність дисертації вимогам «Порядку присудження наукових ступенів». Дисертаційна робота Прокопенко Юлії Сергіївни «Експериментально-теоретичне обґрунтування оптимізації пошуку рослинних протисудомних засобів» є закінченою науковою працею, у якій одержано дані, що є суттєвими у вирішенні проблеми пошуку та дослідження лікарських рослин з метою створення протисудомних лікарських засобів на їх основі. Дана

робота за актуальністю, теоретичним і практичним значенням, використанням сучасних методів і підходів до експериментальних фармакогностичних і фармакологічних досліджень, за обсягом проведених досліджень повністю відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами), а її автор, Прокопенко Юлія Сергіївна, заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 - фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

завідувач лабораторії та клінічного відділу
молекулярної імунофармакології
ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені
І. І. Мечникова НАМН України»,
доктор фармацевтичних наук, професор

 Мартинов А. В.



І. В. Воронкіна