ВІДГУК

офіційного опонента професора, д. мед.н., завідувача кафедри клінічної імунології та мікробіології ХМАПО, директора ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» Мінухіна В. В. на дисертаційну роботу Верховодової Юлії Володимирівни за темою «Фармакологічна ефективність застосування комбінованих фітоекстрактів шавлії лікарської для профілактики та корекції дисбіотичних порушень», подану до спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук
за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність обраної теми

Мікробіота кишечнику є надзвичайно складною та відіграє багато важливих функцій: травну, імунологічну, синтетичну та ін. Захворювання кишечника різної етіології, що супроводжуються порушенням складу мікробіоти приносять людині дискомфорт, зниження працездатності, погіршення загального самопочуття. Актуальними є такі стани як антибіотик-асоційована діарея (ААД), хвороба Крона, коліт, діарея різної етіології, тому що вони виникають у осіб працездатного віку і значно погіршують якість життя. ААД супроводжується дисбіотичними порушеннями та може ускладнюватись *Clostridium difficile (C. difficille)* інфекцією, що є небезпечним патогеном, який може призвести до летальних наслідків. Фармакотерапія *C. difficille* ААД полягає у призначенні ванкоміцина, фідаксоміцина та пробіотиків. Не завжди обрана стратегія призводить до повного одужання та відновлення мікрофлори, тому профілактика та корекція дисбіотичних порушень є актуальним. S. officinalis – рослина, яка володіє протизапальними, антимікробними кровоспинними, ранозагоюючими, вітрогінними властивостями. Фітоекстракти на основі S. officinalis є перспективними для пошуку ефективного та безпечного екстракту для профілактики та корекції дисбіотичних порушень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956, 2014-2023 рр.), в яких автор є співвиконавцем.

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

Обґрунтованість наукових положень і висновків дисертації ґрунтується на достатньому обсязі отриманих експериментальних результатів, їх всебічному аналізі. Дослідження фітоекстрактів S. officinalis виконані на сучасному науковому рівні з використанням адекватних експериментальних моделей та методів дослідження за достатньо інформативними показниками. Для вивчення кожної фармакологічної активності фітоекстрактів S. officinalis автором адекватно підібрані препарати-порівняння.

Достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів, оскільки базується на параметричних і непараметричних методах статистики.

Наукові положення та висновки дисертації є обґрунтованими та узгодженими з метою та задачами дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше експериментально доведено, що досліджувані фітокомплекси S. officinalis при внутрішньошлунковому введенні лабораторним мишам відносяться до V класу, практично нетоксичні речовини згідно з загальноприйнятою класифікацією за К.К. Сидоровим. Отримано нові дані про антимікробний ефект екстрактів S. officinalis на рівні слабоактивних або активних речовин. Доведено, що додавання до екстракта №2 (комплекс фенольних сполук) L-лізину (екстракт № 4) призводить до більш потужної антимікробної дії на більшість штамів у порівнянні з екстрактом № 2. На

основі результатів скринінгових досліджень екстрактами лідерами обрано екстракти №2 та №4. Доведено наукові дані що досліджувані фітокомплекси (№№ 3, 4, 5, 6, 9 та 10) здебільшого мали антидіуретичний ефект у дозах 10-50 мг/кг. Умовно-терапевтичною дозою встановлено 50 мг/кг. Вперше встановлено наукові дані щодо антиексудативної активності фітокомплекса №4 (фенольний екстракт з додаванням L-лізину) яка становила 93% на 4 годину дослідження на моделі карагенінового набряку. Доведено, що на моделі зимозанового набряку найбільш виражена протизапальна активність спостерігалась упродовж двох годин і склала для екстракту №4 – 44%, для екстракту №2 – 40,6%. Встановлено, що екстракти №2 та №4 здатні стабілізувати мембрани клітин на рівні вітаміну Е, при чому екстракт №4 мав більш виражений ефект аніж екстракт № 2. Отримано наукові дані, що екстракт №2 та №4 виявили виразну капілярозміцнювальну активність, екстракт №4 має більш виражений ефект аніж екстракт № 2. Доведено, що фітоекстракт № 4 має судинозміцнювальний ефект. На моделі інфекційного коліту вперше доведено, що фітокомплекси № 2 та № 4 мають антагоністичну активність стосовно *E. coli, C. albicans, S. aureus, C. perfringens.* У порівнянні з рифаксиміном екстракти №2 та №4 не пригнічували представників нормальної мікрофлори. Встановлено пребіотичну активність екстрактів №2 та №4, екстракт №4 перевищував екстракт № 2. Доведено, що при лікуванні фітокомплексами №2 та №4 у дозах 50 мг/кг інфекційного коліту у лабораторних щурів відбувалась нормалізація гематологічних показників периферичної крові. Більш активний ефект притаманний екстракту № 4 – він більш активно пригнічував запальні процеси у слизовій оболонці товстого кишечника лабораторних щурів та перевищував дію препарата порівняння рифаксиміну. Підтверджені антиоксидантні, мембраностабілізуючі, протизапальні властивості фітокомплексів № 2 та № 4 S. officinalis у дозі 50 мг/кг, що за ефективністю значно перевищують препарат порівняння рифаксимін. Екстракт №4 перевищував екстракт № 2 за

ефектом. Вперше отримано наукові дані підтверджуючі позитивну патоморфологічну динаміку при застосуванні екстрактів №2 та №4 на моделі інфекційного коліту у лабораторних щурів. Фітокомплекс №2 у порівнянні з модельною патологією впливав таким чином, що послаблювались дистрофічні, десквамативні, запальні та ерозивно-виразкові процеси. Фітокомплекс №4 мав найбільш виражену дію у порівнянні з фітокомплексом №2 та контролем, яка проявлялась у ліквідації дистрофічних, десквамативних і запальних змін у товстому і тонкому кишечнику лабораторних щурів.

Таким чином, автором науково обґрунтовані LD_{50}, антимікробний ефект, обрано екстракти-лідери (№2, №4), за діуретичною активністю встановлено умовно-ефективну дозу 50 мг/кг, протизапальну активність на моделях карагенінового та зимозанового набряків, капілярозміцнювальну, мембраностабілізуючу активність, антагоністичну активність по відношенню до патогенної та умовно-патогенної флори кишечника, пребіотичну активність, доведено протизапальну, антиоксидантну дію екстрактів за умов експерименту, доведено що фітокомплекси №2 та №4 зменшують дистрофічні, десквамативні, виразково-ерозивні процеси у товстому і тонкому кишечнику лабораторних щурів.

Практичне значення отриманих результатів

В результаті проведених досліджень автором оцінено фармакологічну активність фітокомплексів S. officinalis, встановлено екстракт-лідер №4 та умовно-терапевтичну дозу 50 мг/кг.

Запатентовано спосіб моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями (патент України на корисну модель № 140188; 2020 р., патент України на винахід №122640), спосіб одержання сухого екстракту з листя шавлії лікарської з антиексудативною активністю (патент України на корисну модель № 138320, 2019 р.) та спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя шавлії лікарської з антиексудативною активністю (патент України на винахід №121367, 2020 р.).

Результати дисертаційного дослідження впроваджені в науково-дослідну і науково-педагогічну роботу кафедри фармакогнозії та технології ліків Одеського національного медичного університету (протокол № 5 від 11 грудня 2019 р.). З результатами досліджень отримано сертифікат про впровадження у реєстр Brupharmexport sprl від 10.11.2019, Брюссель.

На основі проведених досліджень і отриманих результатів автором обґрунтовано доцільність подальших доклінічних, клінічних досліджень сполуки лідера на основі екстракту S. officinalis з додаванням L-лізину.

Результати роботи Верховодової Ю.В. є цілком переконливими, їх достовірність не викликає сумніву. Отримані результати, розроблені на їх основі наукові положення і висновки є обґрунтованими, базуються на адекватних методологічних підходах при вирішенні визначених завдань, на достатній кількості експериментального матеріалу, а також на результатах статистичної обробки даних.

Основу роботи складають результати експериментальних досліджень, проведених на адекватних моделях, в ході яких використовували високоінформативні методи дослідження.

Автор проаналізував отримані результати експериментів, співставив їх з даними літератури, провів статистичну обробку матеріалу. Все це дозволило належним чином обґрунтувати наукові положення, висновки, які сформульовані в дисертації.

Основний зміст дисертації та його структура

Дисертація Верховодової Ю.В. написана логічно, послідовно та складається з анотацій українською та англійською мовами, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, викладених у 3-ох розділах, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних літературних джерел, додатків. Обсяг основного тексту викладено на 128 сторінках друкованого тексту. Дисертація ілюстрована

14 таблицями та 10 рисунками. Перелік використаних джерел складає 165 найменувань, з них 49 кирилицею, 116 – латиницею. Отже, структура та обсяг роботи відповідають вимогам МОН України.

Анотація до дисертаційної роботи оформлена згідно з вимогами наказу № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

У вступі чітко обґрунтовано актуальність теми, сформульовані мета і завдання дослідження, сформульовано зв'язок роботи з науковою темою, охарактеризовані новизна і практична значимість одержаних результатів, зазначено особистий внесок здобувача виконаної дисертаційної роботи, публікації та де здійснена апробація результатів дослідження, структура та обсяг роботи.

В огляді літератури автор детально аналізує наукові дані щодо проблеми дисбіотичних порушень, антибіотик-асоційованої діареї, проблем фармакологічної корекції цих станів, перспектив та обґрунтування пошуку фітотерапевтичного засобу для профілактики та корекції вищезгаданих станів.

Огляд літератури складається з 6 підрозділів: 1.1 Антибіотик-асоційована діарея – сучасна проблема антибіотикотерапії; 1.2 Роль *Clostridium Difficile* у формуванні та розвитку антибіотик-асоційованої діареї; 1.3 Зміни складу мікробіому кишечника під впливом антибіотиків; 1.4 Роль (дозозалежність) *Lactobacillus* вмісних пробіотиків в терапії антибіотик-асоційованої діареї; 1.5 Фітотерапія в сучасній медицині; 1.6 Перспективи пошуку нових похідних з шавлії лікарської.

У **першому** підрозділі надана детальна характеристика проблемі сучасного стану застосування та обмежень застосування антибіотиків. Обґрунтовується актуальність антибіотик-асоційованої діареї (ААД), адже ця хвороба вражає лиць працездатного віку і може ускладнюватись *C. difficile* інфекцією, що в свою чергу може призводити до летальних випадків або значного погіршення здоров’я. Детально описані фактори

ризику та етіопатогенез ААД. Автором наведені головні фармакотерапевтичні напрямки та засоби, що застосовуються при дисбіотичніх порушеннях та ААД. Автором використані сучасні літературні дані у тому числі гайдлайни.

У **другому** підрозділі огляду літератури детально висвітлено характеристику, фактори вірулентності *C. difficile,* етапи патогенезу *C. difficile* інфекції, порушення колонізаційної резистентності просвітної нормофлори кишечника і механізмів розвитку діареї, псевдомембранозного коліту.

У **третьому** підрозділі огляду літератури описані механізми порушення колонізаційної резистентності просвітної мікрофлори кишечника, наведені інфекційні агенти окрім *C. difficile,* що можуть викликати ААД (*C. perfringens, S. aureus, K. oxytoca, Candida spp., K. pneumoniae*).

У **четвертому** підрозділі автором висвітлено характеристики *Lactobacillus spp*., що використовуються для корекції дисбіотичних порушень при ААД.

У **п'ятому** підрозділі приведені основні дані щодо стану сучасної фітотерапії в медицині, а саме переваги рослинних засобів над синтетичними: відносно нечасті прояви алергічних та інших негативних реакцій, особливості ефектів рослинних засобів (широта ефекту терапевтичного застосування, поступове збільшення ефекту).

У **шостому** підрозділі літературного огляду розглянуто особливості рослини S. officinalis, її фітохімічний склад, фармакологічні властивості, спектр застосування у медицині. Перевагами застосування фітотерапевтичних засобів є відсутність антибіотикорезистентності, низька вірогідність побічних ефектів, алергії тощо.

Все це, по-перше, відповідає темі дисертації, а, по-друге, визначає актуальність та доцільність проведення даних досліджень.

У **розділі 2** «Матеріали та методи дослідження» представлено опис матеріалів та методів дослідження. Експерименти виконано на 578 тваринах: 362 нелінійних білих щурів, 216 білих мишей отриманих з розплідника віварію ЦНДЛ НФаУ.

Наведені характеристики фітокомплексів S. officinalis (1-11), їх біологічно активних речовин та їх кількісне визначення в кожному екстракті.

У якості референт препаратів використовувались листя шавлії (S. officinalis), фуросемід, гідрохлортіазид, адіурекрин, диклофенак натрію, вітамін Е, альфа нормікс (рифаксимін), кверцетин.

Дисертантом представлено алгоритм дослідження у вигляді схеми. У розділі наведені сучасні токсикологічні, фармакологічні, біохімічні, гематологічні, гістологічні, мікробіологічні та статистичні методи, забезпечуючи комплексність вивчення екстрактів S. officinalis. Дисертантом було застосовано достатній набір адекватних і сучасних методів, які дали можливість розкрити тему дисертації.

3 розділ «Дослідження фармакологічного профілю дії екстрактів S. officinalis» присвячений скринінговому дослідженню гострої токсичності, антимікробної активності, визначення двох екстрактів-лідерів, скринінговому дослідженню діуретичної активності та обрання умовно-терапевтичної дози. Фітоекстракти мали антимікробні властивості на рівні активних або слабоактивних речовин. Екстракти S. officinalis мали здебільшого антидіуретичні властивості на рівні препарату порівняння адіурекрина.

На моделі карагенінового та зимозанового набряку встановлено протизапальну активність екстрактів-лідерів на рівні препаратів порівняння диклофенаку та кверцитину. При дослідженні мембраностабілізуючої активності доведено, що обидва екстракта мають мембраностабілізуючу активність, при чому екстракт № 2 на рівні препарата референта вітаміна Е, екстракт№4 перевищував екстракт № 2 та

препарат порівняння за ефектом. При дослідженні капілярозміцнюючої активності фітокомплексів № 2 та № 4 встановлено їх капілярозміцнюючий ефект, екстракт №4 перевищував за активністю екстракт № 2.

У **розділі 4** «Мікробіологічне дослідження ефекта екстрактів S. officinalis на кишкову мікробіоту при дисбіозі у щурів» проведено дослідження антагоністичної активності по відношенню до представників патогенної та умовно патогенної мікрофлори *in vivo* на моделі інфекційного коліту у лабораторних щурів. Отримано наукові дані що після 5 денного інтрагастрального застосування фітокомплексів № 2 та № 4 у порівнянні з рифаксиміном обидва екстракта володіють антагоністичним ефектом по відношенню до патогенної та умовно патогенної мікрофлори. Фітокомплекс № 2 збільшував загальну кількість *E. coli,* фітокомплекс №4 нормалізував загальну кількість *E. coli*. Екстракти № 2 та № 4 однаково знижували кількість *C. albicans* та дещо знижували кількість клостридій. Екстракт № 4 ефективніше підвищував кількість біфідо і лактобактерій аніж екстракт № 2. Екстракт № 4 мав більш виражену пребіотичну активність аніж екстракт № 2. Препарат порівняння рифаксимін значно зменшував кількість *S. aureus* та ліквідував *C. perfringens, C. albicans* лишилась на підвищеному рівні, а представники нормофлори лакто і біфідобактерії на зниженому. Встановлено пребіотичну активність екстрактів №2 та № 4. В результаті дослідження гематологічних показників у дослідних групах у порівнянні з рифаксиміном на моделі інфекційного коліту у лабораторних щурів встановлено більш виражені ознаки зменшення запалення, нормалізацію ШОЕ та лейкоцитів, також збільшення кількості еритроцитів та гемоглобіну. Автором отримано наукові дані що при інтрагастральному застосуванні фітокомплексів № 2 та № 4 у порівнянні з рифаксиміном відбулася більш виражена нормалізація біохімчних показників (зменшення вмісту сечовини, збільшення вмісту загально білку, зменшення АлАТ у крові та зменшення активних продуктів тіобарбітурової кислоти, вірогідне

збільшення відновленого глутатіону у гомогенаті тканини кишечника лабораторних щурів).

У **розділі 5** «Морфологічне дослідження стінки тонкого та товстого кишечника при інтрагастральному застосуванні екстрактів шавлії лікарської для корекції експериментального інфекційного коліту у щурів» автором доведено, що застосування фітокоплексів № 2 та № 4 призводило до зменшення запальних, дистрофічних, десквамативних, ерозивно-виразкових процесів. Фітоекстракт № 4 мав більш виражену дію аніж екстракт № 2.

Окремо подається узагальнення та всебічний аналіз результатів, авторська інтерпретація та науково обґрунтоване обговорення фактів і виявлених закономірностей. Ознайомлення з наведеними у розділі відомостями, дозволяє скласти уявлення про науково-практичну сутність дисертаційної роботи. Автор вміло узагальнює результати власних досліджень із залученням літературних даних. Проводить аналіз отриманих результатів у порівнянні з референс-препаратами.

Загальні висновки відповідають меті та поставленим задачам дослідження, тобто дисертаційна робота носить завершений характер.

Список літературних джерел оформлений згідно з вимогами і відображає широке опрацювання дисертантом даних літератури.

Повнота викладу наукових положень дисертації в опублікованих працях

За матеріалами дисертації опубліковано 24 наукові роботи, з них 7 статтей у профільних наукових журналах, рекомендованих МОН України , 1 стаття у виданні, що індексується у міжнародній наукометричній базі Scopus, Web of Science, 2 акти впровадження у науково-дослідну та науково-педагогічну роботу кафедри фармакогнозії та технології ліків Одеського медичного університета, 1 акт впровадження у реєстр Brupharmexport sprl, 2 патента України на корисну модель, 2 патента України на винахід, 12 тез доповідей.

Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації

Дисертаційна робота та автореферат написані у науковому стилі. Оформлення автореферату та дисертації відповідає вимогам наказу МОН України №40 від 12.01.17 р. Автореферат відповідає тексту дисертації.

Разом з загальною позитивною оцінкою роботи слід відмітити деякі зауваження та пропозиції: за своїм об'ємом окремі таблиці є занадто великі; деякі підрозділи дисертації переобтяжені цифровим матеріалом.

Проте, вказані зауваження не мають принципового характеру, не зменшують науково-практичного значення роботи та не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи Верховодової Ю.В.

Крім того, хотілось би почути відповіді дисертанта на запитання, що виникли у процесі рецензування:

1. Скажіть, будь ласка, в літературному огляді Ви наводите етіологічну структуру ААД, та при дослідженні антибактеріальної активності Ви не вивчаєте вплив ваших фітоекстрактів на основні мікроорганізми, які відповідні за виникнення ААД?

2. При дослідженні діуретичної активності, Ви встановлюєте фітоекстракти-лідери та їх умовно-терапевтичні дози за антидіуретичною активністю? Чому саме за цією активністю Ви це робите?

3. Які діючі БАР шавлії лікарської визначають її встановлені фармакологічні ефекти?

Відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам МОН України.

Дисертаційна робота Верховодової Юлії Володимирівни за темою «Фармакологічна ефективність застосування комбінованих фітоекстрактів шавлії лікарської для профілактики та корекції дисбіотичних порушень» є завершеною науковою роботою, яка присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, що полягає в дослідженні фітокомплексів шавлії лікарської, визначення екстракта лідера (екстракт № 4 – комплекс

фенольних сполук з додаванням L – лізина) та умовно ефективної дози 50 мг/кг для корекції та профілактики дисбіотичних порушень.

За актуальністю, науковою новизною, практичним значенням, методичним рівнем робота Верховодової Ю.В. «Фармакологічна ефективність застосування комбінованих фітоекстрактів шавлії лікарської для профілактики та корекції дисбіотичних порушень» відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ України №567 від 24.07.2013 р. (зі змінами) та Наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри клінічної імунології
та мікробіології ХМАПО,
директор ДУ «Інститут мікробіології
та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»,
д. мед.н., професор В. В. Мінухін

Підпис В. В. Мінухіна
ЗАСВІДЧУЮ:
Начальник відділу кадрів
ДУ "ІМІ НАМН"

УКРАЇНА * ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА * НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ * МІСТО ХАРКІВ
ВІДДІЛ КАДРІВ №02012208

Н.А.Бєлякова