

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Линди Олесі Сергіївни
«Фармакологічне дослідження фітозасобів з хости
ланцетолистої (*Hosta lancifolia* Engl.)», подану до
спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при
Національному фармацевтичному університеті
МОЗ України

для захисту на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю
14.03.05 – фармакологія, 22 – охорона здоров'я

Актуальність теми дисертації. На даний час існує багато факторів, що викликають захворювання печінки та серця.

Пусковим механізмом для метаболічних змін при серцево-судинних захворюваннях є різного роду стресогенні фактори, які ініціюють зростання рівня ендогенних катехоламінів в організмі. Адреналін у високих концентраціях сприяє порушенню кровопостачання, провокує метаболічний дисбаланс, зокрема активує систему перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), викликає появу активних форм кисню (АФО), збільшує накопичення іонів кальцію та ін. Як при токсичних ураженнях міокарда, так і при токсичному ураженні печінки розвивається оксидативний стрес, за якого генерація активних форм кисню призводить до руйнівних процесів. «Оксидативний стрес» - стан, при якому спостерігається підвищений вміст вільних радикалів, викликаний порушеннями балансу в системі «процеси ПОЛ – антиоксидантна система». Причиною цього є незадовільний екологічний стан довкілля, неякісні продукти харчування, стреси, лікарські препарати, шкідливі звички. Довготривалий стан оксидативного стресу призводить до розвитку більш ніж 200 захворювань, зокрема серцево-судинних нейродегенеративних, онкологічних, цукрового діабету, гепатитів різного генезу та інших.

У зв'язку з вищевикладеним пошук нових ефективних препаратів, які можна було б застосовувати при патологіях, що супроводжуються розвитком вільнорадикальних процесів, набуває все більшої актуальності. Значне місце в клінічній практиці займають препарати рослинного походження.

Сучасні схеми фармакотерапії токсичних гепатитів передбачають застосування рослинних препаратів з гепатопротекторними гепаторегенераційними властивостями. У комплексній терапії захворювань міокарда найбільш широкого застосування знаходять лікарські рослинні засоби з антиоксидантними властивостями, зокрема флавоноїдної природи. Враховуючи вищезазначене, як перспективну сировину було вибрано листя хости ланцетолистої, яка містить фенольні сполуки, вітаміни, органічні кислоти, полісахариди та інші біологічно активні речовини, що можуть забезпечити гепатопротекторну та кардіопротекторну дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота Линди О. С. виконана за планом науково-дослідних тем кафедри управління та економіки фармації, клінічної фармації та фармації ННІ ПО «Маркетингові, фармако-технологічні та технологічні дослідження зі створення лікарських засобів» (№ державної реєстрації 0115U001530) та фармації ННІ ПО, медичної біохімії, загальної гігієни та екології, функціональної діагностики, патологічної анатомії Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського "Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу" (№ державної реєстрації 0116U003353), в яких автор є співвиконавцем.

Оцінка змісту дисертації. Дисертація побудована відповідно до вимог Наказу № 40 від 12.01.2017 р МОН України і містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, 3 розділи власних досліджень, розділ «аналіз та узагальнення результатів», висновки, список використаних джерел, додатки.

Вступ містить усі положення, передбачені для цієї частини дисертації. У ньому обґрунтовано актуальність обраної теми. Мета дослідження сформульована чітко, лаконічно й узгоджується з назвою роботи. Завдання підпорядковані меті дослідження. Об'єкт та предмет дослідження сформульовані як філософські категорії, що відображають суть спрямування проведених експериментів. Детально вказано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, внесок автора та інших осіб, що брали участь у дослідженні, відомості про апробацію роботи на наукових форумах.

Розділ 1 – огляд літератури присвячений сучасним уявленням про поширення, етіологію та патогенез токсичних захворювань печінки і серця, їх фармакологічну корекцію. Описаний вільнорадикальний механізм розвитку тетрахлорметанового гепатиту та підходи до лікування токсичного гепатиту, модель якого використана далі у власних дослідженнях автора. Описані рослинні гелатопротектори та препарати, які містять есенціальні фосфоліпіди. І ті, і інші лікарські засоби застосовуються для фармакотерапії токсичних уражень печінки.

Другою експериментальною патологією, що використана в даній фармакологічній роботі було гостре ураження міокарда адреналіном, що призводить до міокардіодистрофії. Патогенез даної патології детально описаний в розділі 1.3.1 огляду літератури і пов'язаний з високим навантаженням під дією адреналіну, енергетичним виснаженням на тлі впливу симпатичної інервації, значним підвищенням процесів ПОЛ в органі та структурними змінами в міокарді. Ключовим у розвитку адреналінової міокардіодистрофії є активація процесів ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів, накопичення вторинних ендогенних токсичних продуктів, які індукують мембранодеструктивні процеси в клітинах міокарду; переважання анаеробних процесів в енергозабезпеченні, як наслідок викликаних катехоламінами гемодинамічних порушень і гіпоксичних явищ.

Ефективним засобом захисту від оксидативних уражень, зокрема при міокардіодистрофії, є застосування антиоксидантів та антигіпоксантів — біологічно активних речовин, що мають антирадикальні або антиокиснювальні властивості, покращують утилізацію циркулюючого в організмі кисню та підвищують стійкість до гіпоксії.

Широким спектром активності відрізняються препарати на основі речовин флавоноїдної природи. Широке застосування лікарських засобів на основі даних речовин зумовлено вираженими антирадикальними властивостями. Описані ефективні та широко використовувані в медичній практиці такі рослинні лікарські засоби з антиоксидантними та антигіпоксантними властивостями: препарати Кверцетину у пероральній та ін'єкційній (Корвітин) формах. Для останнього препарату доведена клінічна ефективність при гострому інфаркті міокарда — здатний зменшувати дозу некрозу. Описаний комплексний препарат Кверцетину з ліпідом — Ліпофлавіон, який є антиоксидантом та мембраностабілізатором. Виражену кардіотонічну, антиангінальну, антиритмічну, антигіпоксичну та антиагрегантну дію виявляє комплексний препарат Кратал, що містить екстракт глоду та тауринову амінокислоту.

Виражену кардіопротекторну дію має препарат Кардіотон, що містить екстракт глоду, іони магнію, калію та фолієву кислоту. Крім прямого кардіотропного впливу екстракту глоду, препарат нормалізує рівень зазначених мікроелементів, зменшуючи явища дистрофії міокарда.

Велику увагу автор приділяє в огляді літератури описанню видів хости, їх хімічному складу, наявності флавоноїдів з групи кемферолу і кверцетину, стероїдних сапонінів, сапогенінів, полісахаридів, вітамінів, цукрів, аскорбінової кислоти, протопектинів, пектинів та катехінів. Всього за даними літератури описано 82 сполуки, що виділені з представників роду хости.

Об'єктами даного дослідження стали настойка та сухий екстракт з хости ланцетолистої, що мають виявляти антимікробні, протизапальні, антиоксидантні та інші види фармакологічної дії, описані вище.

Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження» починається з опису обраних сполук германію з ніотиновою кислотою, наведено їх хімічні формули. Розділ містить схему загального дизайну дослідження, відомості про використаних лабораторних тварин, наведено методику відтворення експериментальної патології, опис методів визначення показників та статистичної обробки результатів. Дисертантом обґрунтовані вибір доз та шляхів уведення досліджуваних об'єктів. Матеріали, моделі та методи, використані в роботі, дозволяють об'єктивно та комплексно вирішити завдання та досягти поставленої мети.

Описанню результатів власних досліджень присвячені розділи 3, 4, 5 і аналізу та узагальненню результатів присвячений розділ 6.

У третьому розділі описані дані показників гострої токсичності, деяких видів фармакодинаміки (гепатопротекторна та протизапальна), можливих проявів побічної дії (ульцерогенної та місцевоподразнювальної дії) настойки та сухого екстракту з хости ланцетолистої у порівнянні з силімаріном та диклофенаком натрію.

За результатами *розділу 3* встановлено, що:

- ЛД₅₀ для сухого екстракту з листя хости ланцетолистої знаходиться за межами 5000 мг/кг. Екстракт з листя хости при внутрішньошлунковому введенні належить до V класу токсичності – практично нетоксичні речовини. ЛД₅₀ для 50% настойки з листя хости ланцетолистої знаходиться за межами 15000 мг/кг, що дозволило віднести її до VI класу токсичності – відносно нешкідливі речовини.

- Умовно-терапевтична доза сухого екстракту з листя хости ланцетолистої встановлена як 100 мг/кг, для настойки 0,15 мл/кг, введення яких проявило коригувальний вплив на процеси ліпопероксидації, показники антиоксидантної системи та проникність плазматичних мембран гепатоцитів в організмі тварин після ураження тетрахлорметаном.

- Введення тваринам з карагеніновим набряком настойки та екстракту з хости ланцетолистої призвело до вірогідного прояву анти

ексудативної дії, максимум якої прийшовся на 24 год розвитку запалення. Ефективність застосування екстракту в кінці експерименту становила 33,3%, у настойки 28,9%. Таким чином, сухий екстракт з листя хости в дозі 100 мг/кг та настойка в дозі 0,15 мл/кг виявляють виразні антиоксидантні властивості та протизапальні і не виявляють ульцерогенної та місцевопоздрознювальної дії.

У розділі 4 дисертаційної роботи висвітлені результати поглибленого вивчення гепатопротекторних властивостей настойки та сухого екстракту з листя хости ланцетолистої на моделі тетрахлорметанового гепатиту у щурів у порівнянні з силімарином та фламіном.

ПОЛ досліджували за вмістом ТБК-активних продуктів у сироватці крові, максимум якого спостерігався на 14-ту добу дослідження (в 1,4 разу перевищував норму). У гомогенаті печінки даний показник у 2 рази був вище інтактного контролю. Одночасно відмічено підвищення вмісту 2,4-динітрофенілгідразонів – продуктів переокиснення протеїнів у сироватці крові та гомогенаті печінки тварин після ураження. Застосування настойки з листя хости ланцетолистої в дозі 0,15 мл/кг призвело до вірогідного зниження ($p \leq 0,05$) показників ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів в організмі уражених щурів.

Настойка з листя хости ланцетолистої проявила позитивний вплив на показники антиоксидантної системи: рівень супероксиддисмутази та каталази активностей у гомогенаті печінки наблизився до норми, вміст церулоплазміну знизився на 70 % до кінця експерименту відносно рівня уражених щурів.

Застосування настойки з листя хости ланцетолистої сприяло відновленню структури та стабілізації плазматичних мембран гепатоцитів. Підтвердженням мембраностабілізуючої дії настойки було зниження активності аланін- та аспартатамінотрансферази у сироватці крові уражених щурів (у 2,1 та 1,4 рази відповідно).

Доведена антиоксидантна активність сухого екстракту з листя хости ланцетолистої на моделі тетрахлорметанового ураження печінки щурів, що проявляється пригніченням вільнорадикальних процесів, зокрема

ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів та відновленням активності антиоксидантної системи.

Доведена гепатопротекторна активність екстракту з листя хости, введення якого в уражений організм супроводжувалось зниженням активностей амінотрансфераз та лужної фосфатази, а також відновленням жовчовидільної та жовчоутворювальної функцій печінки.

Встановлено відновлення жовчовидільної та жовчоутворювальної функції печінки в організмі уражених тетрахлорметаном тварин, про що свідчить збільшення швидкості секреції жовчі (на 16%) та її об'єму (на 14%) у групі тварин, які піддавались корекції настійкою ($p \leq 0,05$), позитивний вплив на дані показники також проявив сухий екстракт.

Настійка та сухий екстракт з хости ланцетолистої підвищували антитоксичну дію печінки (зниження вмісту молекул середньої маси обох фракцій протягом всього експерименту).

Морфологічне дослідження структури печінки під дією настійки та сухого екстракту з хости ланцетолистої та препарату порівняння Силімарину показало, що на 14 добу експерименту усі досліджувані фармакологічні агенти сприяли посиленню регенераторної активності гепатоцитів. Спостерігали відновлення балкової організації та збільшення кількості двоядерних клітин.

У розділі 5 наведені результати кардіопротекторних властивостей сухого екстракту з листя хости ланцетолистої на моделі адреналінового ураження міокарда щурів у порівнянні з корвітином.

Дослідженнями встановлені антиоксидантні властивості сухого екстракту з листя хости, які підтверджуються зниженням процесів перекисного окиснення ліпідів та окиснених протеїнів в організмі тварин після застосування токсиканту та відновленням ендогенної антиоксидантної системи, на що вказує підвищення супероксиддисмутазної та каталазної активностей, а також вмісту відновленого глутатіону.

Сухий екстракт з листя хости ланцетолистої проявив помірні мембранопротекторні властивості в умовах адреналінової міокардіодистрофії,

які реалізуються через прояв антиоксидантного ефекту даного фармакологічного препарату.

Морфологічними дослідженнями серця тварин підтверджено позитивний вплив сухого екстракту з хости ланцетолистої на структуру міокарду.

Аналіз та узагальнення результатів дослідження являє собою заключну частину дисертації, в якій автор підсумовує отримані результати, обґрунтовує наявність антиоксидантних, мембранопротекторних та гепато- і кардіопротекторних властивостей досліджуваних об'єктів, порівнює одержані дані з раніше відомими та пояснює механізм дії останніх.

Висновки логічно випливають з результатів дослідження та їх аналізу. Вони насичені фактами та відповідають завданням дослідження.

Список використаних джерел містить 273 джерела, включаючи роботи самого автора. Він оформлений з урахуванням вимог до цієї частини рукопису (див. Наказ № 40 від. 12.01.2017 р). Джерела, що опубліковані за останні 10 років (2010-2019 р.р.) склали 64,5%.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше доведена нетоксичність сухого екстракту та настойки з листя хости ланцетолистої та встановлено, що обидва фармакологічні препарати відносяться до V класу токсичності – практично нешкідливі речовини. Запропонована умовно терапевтична доза сухого екстракту – 100 мг/кг та настойки – 0,15 мл/кг маси тіла тварин, які визначені на моделі тетрахлорметанового ураження печінки. На моделі карагенінового набряку лапи щурів встановлена протизапальна активність лікарських форм з хости ланцетолистої, яка більш виражена у сухого екстракту. Вперше запропоновано для корекції токсичних уражень печінки настойку (екстрагент 50% спирт етиловий (об/об)) та сухий екстракт з листя хости ланцетолистої. В експерименті на тваринах з модельованим гострим тетрахлорметановим гепатитом доведена ефективність настойки та сухого екстракту з листя хости як гепатопротекторних засобів, ефективність яких пов'язана з їх антиоксидантними властивостями. Доведено, що сухий

екстракт проявляє більш виражені антиоксидантні та мембраностабілізуючі властивості у порівнянні з настойкою.

За умов ураження міокарду підвищеними дозами адреналіну доведені кардіопротекторні властивості екстракту з листя хости, які зумовлені наявністю в досліджуваному фармакологічному засобі значної кількості фенольних сполук, органічних кислот та вітамінів.

За результатами досліджень отримано патент України на корисну модель (UA 127775 U від 27.08.2018).

Практичне значення одержаних результатів Підібрані та запропоновані для подальших досліджень мінімальні діючі дози сухого екстракту та настойки з листя хости ланцетолистої.

Доведена відсутність токсичності даних фармакологічних засобів та відсутність місцевсподражнювальної та ульцерогенної дій.

Виявлення гепатопротекторних властивостей сухого екстракту та настойки з листя хости дозволить провести подальше вивчення даних лікарських засобів з метою впровадження їх у виробництво та використання для лікування захворювань печінки.

Доведені кардіопротекторні властивості сухого екстракту з листя хости на моделі адреналінової міокардіодистрофії зможуть бути використані при створенні нових кардіопротекторних засобів, які будуть включені до комплексних схем лікування серцево-судинних захворювань.

Результати досліджень застосовуватимуться в кардіології, гепатології, біохімії та фармації.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у науково-навчальний процес кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова.

Обсяг і структура дисертації. Загальний обсяг дисертаційної роботи разом зі списком літератури та додатками складає 240 сторінок комп'ютерного друку, містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, висновки, список літературних джерел, додатки. Робота проілюстрована 47 таблицями та 38 рисунками. Список використаних джерел налічує 273 найменування, з них 200 кирилицею та 73 латиною.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Наукові положення дисертаційної роботи Линди Олесі Сергіївни мають достатній рівень обґрунтованості й достовірності, оскільки базуються на адекватних методах дослідження, достатній кількості експериментів, коректній математичній і статистичній обробці та професійній інтерпретації результатів.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах і в авторефераті. Результати, одержані дисертантом, широко висвітлені в наукових публікаціях (14 наукових праць), з яких 6 статей, серед яких 5 - у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 стаття - у зарубіжному фаховому науковому виданні, 1 патент України на корисну модель, 1 інформаційний лист, 6 тез доповідей. Видання віддзеркалюють основні результати досліджень Линди О. С. Автореферат дисертації написаний змістовно, грамотно і чітко як за структурою, так і за змістом, відображає основні положення роботи.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту й оформлення. Тексти дисертації та автореферату викладено українською мовою із дотриманням наукового стилю. Оформлення дисертації та автореферату відповідає вимогам щодо викладення, об'єму, структури, посилань на джерела літератури. Проте виникли деякі зауваження і запитання.

Зауваження:

1. На стор. 85, 86 диклофенак натрію проявив дуже низьку протизапальну активність, для нього це не характерно. Як правило, в експерименті він показує антиексудативну активність від 50 до 70%. Це мабуть був експериментальний артефакт, треба було переставити дослід для точності.

2. На стор. 102 автор вказує, що на 14-ту добу експерименту НХЛ була більш ефективною по відношенню до ЛФ у сироватці крові у порівнянні з ГП (Силімарин). Таке твердження немає під собою підґрунтя, бо з табл. 4.8 видно, що показники не мають між собою достовірних відмінностей.

3. У розділі 4 в рисунках повторюються дані таблиць. Так дані в табл. 4.12 наведені на рис.4.6; в табл. 4.10 на рис. 4.4 та рис. 4.5; в табл. 4.19 - на рис. 4.7 та 4.8; та інші.

4. По тексту дисертації зустрічаються помилки, невдалі та неакадемічні вирази як то: «метаболічний гомеостаз», ступеня – вірно ступеню, замість «альтеративні зміни» - «альтернативні зміни» та інші.

Запитання:

1. Відомо, що антиоксиданти фенольної структури при збільшенні дози виявляють прооксидантні властивості. Чи досліджували ви інтервали доз настойки і сухого екстракту хости ланцелистої, в якому вони з антиоксидантів перетворюються в прооксиданти?

2. Які Ваші плани на подальше впровадження досліджуваних об'єктів у фармацевтичне виробництво?

3. Поясніть, будь ласка, механізм розвитку адреналінової кардіодистрофії і на скільки ефективно на такій короткій моделі відбувається відновлення структури міокарду під впливом фармакоекономічних препаратів хости ланцелистої?

Рекомендації щодо використання результатів дисертації у практиці.
Матеріали можуть бути використані для подальшого вивчення настойки та сухого екстракту з листя хости ланцелистої з метою розробки лікарських засобів з виразними антиоксидантними властивостями, що забезпечують їх гепато- та кардіопротекторні властивості.

Висновок. Ознайомлення з представленою роботою дозволяє зробити загальний висновок, що дисертація Линди Олесі Сергіївни за темою «Фармакологічне дослідження фітозасобів з хости ланцетолистої (*Hosta lancifolia* Engl.)» є самостійним завершеним науковим дослідженням, яке вирішує нову наукову задачу щодо пошуку гепато- та кардіопротекторів рослинного походження, отриманих на основі хости ланцелистої: настойки та сухого екстракту. Впровадження досліджуваних фармакологічних препаратів сприятиме розширенню асортименту вітчизняних високоефективних та нешкідливих лікарських засобів для лікування захворювань печінки та серця, в патогенезі яких важливу роль відіграють процеси перекисного окиснення ліпідів.

За своєю актуальністю, новизною, методичними підходами та обсягом проведених досліджень зазначена робота повністю відповідає сучасним вимогам, які пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а саме п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами), а її автор Линда О.С. заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук із спеціальності 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент

доктор фармацевтичних наук, професор,

завідувач кафедри фармакоелектрофізіології

Національного фармацевтичного університету

заслужений діяч науки і техніки України

Підпис проф. Л.В. Яковлевої ЗАСВІДЧУЮ

Нач. ВК НФаУ



Л. В. Яковлева

З.Ф. Подстрелова