

ВІДГУК

офіційного опонента доктора фармацевтичних наук, професора, завідувачки кафедри фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету Єрмоленко Тамари Іванівни на дисертаційну роботу Кириченко Інни Володимирівни за темою «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей екстракту з трави маруни дівочої», яку подано до спеціалізованої Вченої ради ДФ 64.605.071 Національного фармацевтичного університету МОЗ України, утворена наказом Національного фармацевтичного університету від 06.11.2023 р. № 107-Адм. для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

Актуальність обраної теми.

Джерелами отримання хімічних сполук які володіють лікарськими властивостями також є і рослини. Рослини використовувалися людством з давніх давен і інтерес до них залишається до сьогоднішніх днів, хоча відношення фахівців практичної медицини до них мінялося від захопленого до скептичного, якщо взяти за приклад серцеві глікозиди. А так, як у суспільстві повертається мода на все «природне», тобто натурального походження їжа, одяг, товари побуту, то і в галузі охорони здоров'я невщухає інтерес до ліків природнього походження. Хоча лікарями вони не розцінюються у якості основних груп лікарських засобів, що застосовуються в лікуванні серйозних захворювань, тому препарати рослинного походження не внесені у протоколи лікування таких серйозних захворювань як хронічна хвороба нирок, запальні захворювання сполучної тканини, гіпертонічна хвороба та інші.

Як пояснюють прихильники лікарських засобів рослинного походження, зростання використання фітопрепаратів зумовлено, в першу чергу, саме їхньою високою безпекою, а також більш фізіологічним втручанням у біохімічні процеси людського організму, що обумовлено подібністю структури біологічно активних речовин рослин за своєю будовою активним речовинам організму. Ще однією важливою перевагою фітозасобів є полімодальність фармакологічної дії, тобто здатність впливати на різні клітинні та молекулярні мішені, які задіяні в розвитку патологічного процесу, зокрема запалення та болю, що зумовлює їхню високу клінічну ефективність і більшу безпеку порівняно з синтетичними протизапальними препаратами, зокрема порівняно з НПЗЗ.

Враховуючи філософський закон, коли кількісні зміни шляхом поступового нагромадження спричиняють появу нової якості, виконуючи роль

руху і розвитку можна стверджувати, що велика кількість досліджень з вивчення властивостей біологічно активних речовин лікарських рослин і призведе до того, що відбудеться взаємний перехід кількості у якість. І тоді препарати рослинного походження займуть гідне місце в лікуванні багатьох захворювань. Тому дослідження, які проведено здобувачем Кириченко Інною Володимирівною вважаю актуальними з вивчення перспективної лікарської рослини з прогнозованими протизапальними та анальгетичними властивостями маруни дівочої – *Tanacetum parthenium*. Результати якої будуть додані у золоту скарбницю НФаУ з досліджень біологічно активних речовин рослинного світу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами робота виконана за планом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0103U000478), в якій дисертант є співвиконавцем.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність ґрунтується на проведених фармакологічних, біохімічних, імуноферментних, гістологічних методах дослідження та отриманих експериментальних результатів, їх аналізі. Достовірність яких підтверджується методами статистичного аналізу обраного здобувачем. Фармакологічні дослідження проведені відповідно до методичних рекомендацій з доклінічного дослідження лікарських засобів та у відповідності до етичних принципів експериментів на тваринах, регламентованих Європейської конвенції та Законом України № 249 від 01.03.2012 р., що засвідчено висновком комісії з біоетики НФаУ (протокол № 6 від 25.06.2021 р.).

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

Наукова новизна отриманих результатів роботи полягає в тому, що дисертантом вперше вивчено гідрофільний екстракт маруни дівочої (ГЕМД) та ліпофільний екстракт маруни дівочої (ЛЕМД), де встановлено терапевтично ефективна доза ГЕМД 50 мг/кг за анальгетичною активністю на моделі «гаряча пластина» та «оцтовокислі корчі», який перевищив активність ліпофільного екстракту маруни дівочої (ЛЕМД).

На моделях карагенінового, зимозанового та гістамінового набряку доведена наявність протизапальної активності ГЕМД, який за результатами досліджень не поступається ефективності диклофенаку натрію та кверцетину.

Уперше експериментально доведена виразна протизапальна дія ГЕМД на моделі ад'ювантного артриту (зниження величини набряку на рівні 32 %),

зниженням маркерів запалення: С-реактивного білку (відповідно $17,33 \pm 2,11$ проти $34,67 \pm 3,71$ г/л ($p < 0,05$) на 14 добу $14,67 \pm 2,47$ проти $32,0 \pm 4,00$ г/л ($p < 0,05$) на 28 добу), вмісту маркерів деструкції суглобової тканини: сіалових кислот ($2,18 \pm 0,064$ проти $4,05 \pm 0,15$ ммоль /л, $p < 0,05$), лужної фосфатази до рівня інтактних тварин ($3,04 \pm 0,17$ проти $5,63 \pm 0,21$ мккат/л, $p < 0,05$).

Гістологічно доведено протективний вплив ГЕМД на стан суглобового хряща (зниження кількості тварин із деструкцією суглобового хряща у 2,6 рази порівняно з контрольною патологією) та здатність гальмувати запальний процес у синовіальній оболонці та періартикулярних тканинах (зниження кількості тварин із вираженим запальним процесом у синовіальній оболонці та періартикулярних тканинах у 3 рази).

Вперше дисертантом встановлено, що у механізмі протизапальної дії ГЕМД проявляв імунокоригувальні властивості (зниження вмісту прозапальних цитокінів: ІЛ- 1β – у 1,8 разу, ФНП- α – у 2,2 разу та підвищення рівня протизапального цитокіну ІЛ-10 в 1,6 разу порівняно з контрольною патологією).

Розширено уявлення щодо тосикодинаміки ГЕМД: відсутність подразливої дії на слизову оболонку шлунку та впливу на виділення шлункового соку та його фракційний склад та наявність гастропротективних властивостей (зниження ступеню виразкового пошкодження шлунку на 80% порівняно з контролем), відсутність негативної дії на поведінку і загальнотрофічні показники тварин.

Новизна проведених досліджень захищена патентом України на корисну модель.

Практичне значення отриманих результатів

Результати проведеної здобувачкою Кириченко І.В. роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр вищих медичних навчальних закладів України.

Авторкою роботи не надано обґрунтування, доцільності подальшого вивчення та створення лікарського препарату для застосування ГЕМД в практичній медицині та обґрунтування при яких захворюваннях може бути застосовано потенційний засіб. Бо в цьому і полягає практична цінність проведеної наукової роботи.

Основний зміст дисертації та його структура

Дисертація Кириченко Інни Володимирівни викладена логічно науковою мовою і послідовно складається з анотацій українською та англійською мовами, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, викладених у 4-х розділах, аналізу та узагальнення результатів

досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел, додатків, які складаються з додатку А-списку публікацій та апробації результатів та додатку Б-4 Актів впровадження результатів дослідження.

Робота ілюстрована 14 таблицями, 19 рисунками. Список використаних джерел містить 302 найменування, з них 32 кирилицею та 270 латиницею.

Отже, структура та обсяг роботи відповідають вимогам МОН України.

Анотація до дисертаційної роботи оформлена згідно з вимогами до оформлення дисертацій.

У вступі автором обґрунтовано актуальність вибраної теми, сформульовано мету і завдання, об'єкт та предмет дослідження, методи дослідження, зв'язок роботи з науковими темами, охарактеризовані наукова новизна і надано практичне впровадження результатів роботи у науково-педагогічний процес, зазначено особистий внесок здобувача у виконанні дисертаційної роботи, апробація результатів дослідження, структура та обсяг роботи.

В огляді літератури автором проаналізовано патофізіологічні механізми розвитку запалення. Запальний процес є універсальною реакцією організму на дію пошкоджуючих факторів, який викликає неприємний сенсорний і емоційний стан. У багатьох випадках запалення відіграє захисну роль, сприяє обмеженню вогнища пошкодження. Однак при генералізованих формах запального процесу, особливо коли він набуває гіперергічного характеру, запалення може призводити до значного пошкодження тканини або органу. Раннє призначення засобів протизапальної дії є обов'язковим компонентом лікування. Здобувачем охарактеризовано сучасні підходи фармакологічної корекції запалення і болі, яка виникає як відповідь на запалення. А також місце фітозасобів, роль біологічно активних речовин (БАР) лікарських рослин щодо механізмів їх протизапальної активності. Зважаючи на дані про протизапальні та анальгетичні властивості багатьох БАР рослинного походження дисертантом надана характеристика рослини – маруни дівочої (*Tanacetum parthenium* (L.)), представник родини Айстрові, як перспективне джерело БАР.

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» надано інформацію стосовно об'єктів дослідження гідрофільного густого екстракту маруни дівочої (ГЕМД) стандартизованого за якісним складом і кількісним вмістом 12 сполук та ліпофільного густого екстракту маруни дівочої (ЛЕМД) стандартизованого за вмістом партеноліду – не менше 2,5%, які були отримані на кафедрі ботаніки НФаУ під керівництвом проф. Т. М. Гонтової.

Для пошуку оптимальної терапевтичної дози дисертанткою проведено скринінгові дослідження екстрактів за протибольовою дією на моделі «гаряча пластина» у якій задіяні центральні механізми формування болю.

Для вивчення периферичного компонента анальгетичної дії досліджуваних екстрактів дисертантом використано модель «оцтовокислих корчей».

З метою дослідження протизапальних властивостей досліджуваних екстрактів була використана моделі зимозанового, карагенінового, гістамінового набряку набряку.

Для підтвердження наявності протизапальної дії досліджуваного ГЕМД дисертантом використано модель хронічного запалення ад'ювантного артриту, яке супроводжується ураженням тканин суглобів, і найбільш близько відтворює патогенез і морфофункціональні зміни при колагенових захворюваннях у людей. Вивчались інформативні фізичні, клінічні, біохімічні показники. У якості референт препаратів використовувались препарати диклофенак-натрію в табл., кверцетин в гранулах, метамізол натрію, лоратодин у дозах з урахуванням коефіцієнту видової чутливості.

З метою порівняльної оцінки фармакологічної дії досліджуваних засобів і верифікації інтенсивності патологічного процесу на моделях проведено гістологічне дослідження.

Надано методику дослідження впливу ГЕМД на стан слизової оболонки шлунку і параметри його гострої токсичності.

Інною Володимирівною було застосовано достатній набір сучасних методів та показників, які дали можливість розкрити тему дисертації.

У розділі 3 Скринінгові дослідження анальгетичної активності ліпофільного та гідрофільного густих екстрактів трави маруни дівочої (*Tanacetum parthenium* L.) автором роботи доведено, що досліджувані ЛЕМД та ГЕМД екстракти трави маруни дівочої (*Tanacetum parthenium*) виявляють анальгетичну активність в тесті «Гаряча пластина» у найбільш ефективній дозі 50 мг/кг. Найбільш фармакологічно активним ГЕМД був на рівні 31; 47 та 37% відповідно на першу, другу та третю годину тестування, що супроводжувалося статистично достовірним підвищенням часу до появи відповіді на ноцицептивну стимуляцію порівняно з вихідними даними.

Для ЛЕМД встановлена достовірна анальгетична активність на першу та другу годину тестування на рівні 32 та 48%. Але обидва екстракти поступалися обом препаратам порівняння метамізолу натрію та диклофенаку натрію.

Встановлено виразну анальгетичну дію досліджуваних екстрактів у дозі 50 мг/кг на моделі «Оцтовокислі корчі», де задіяні переважно периферичні механізми формування болю. Спостерігалось достовірне зниження кількості корчів в 3,2 і в 2,9 рази ($p < 0,05$) відповідно під впливом ГЕМД і ЛЕМД порівняно з контролем.

Отже, за результатами дослідження встановлені анальгетичні властивості досліджуваних засобів ГЕМД та ЛЕМД на моделях болю, в розвитку якого

задіяні як центральні, так і периферичні механізми. Очевидно, що фармакологічна активність досліджуваних екстрактів з трави маруни дівочої, як пояснює автор, забезпечується наявними БАР.

Розділ 4 Дослідження протизапальної активності екстрактів з трави маруни дівочої

За літературними даними поліфенольні сполуки рослин надають протизапальну дію яка пов'язана із безпосереднім впливом їх на клітинні та судинно-тканинні мембрани, впливом на провідні системи нейрогуморальної та нейроендокринної регуляції. Дисертанткою вивчено протизапальну активність трави маруни дівочої (*Tanacetum parthenium* L.) екстрактів густих: ліпофільного та гідрофільного на патологічних моделях зимозанового, карагенінового, гістамінового набряку.

На моделі зимозанового набряку встановлено, що ГЕМД в дозі 50 мг/кг виявив протизапальний ефект практично однаковий впродовж всього періоду дослідження, що свідчить про здатність екстракту гальмувати як вивільнення лейкотрієнів, так і простагландинів (середнє значення АЕА 34,9 %) тоді як ЛЕМД виявив найменшу протизапальну дію впродовж всього терміну дослідження (середнє значення АЕА 14,3 %).

Тому для подальшого вивчення протизапальної активності дисертантом був обраний ГЕМД як такий, що виявляє як аналгетичну, так і протизапальну активність.

На моделі карагенінового набряку профілактичне введення ГЕМД, кверцетину та диклофенаку натрію гальмувало розвиток набряку при введенні флогогену. На ранніх стадіях під впливом ГЕМД максимальний ефект пригнічення набряку складав 71,0-73,2 %, при чому залишався стабільно високим і на піці запалення (3 година від введення карагеніну) – 78,3% та практично не поступався в цей період препарату порівняння диклофенаку натрію, протизапальна дія якого складала 80,9%.

Протизапальна активність досліджуваного екстракту мала практично таку ж динаміку, як у антиліпооксигеназного засобу кверцетину згідно результатів дослідження автором роботи.

Здатність ГЕМД впливати на медіатори ранньої фази запального процесу також була виявлена на моделі гістамінового набряку. Де протизапальна дія складала 57,8; 51,8; та 49,1 % відповідно на 30 хв, 1 та 1,5 години набряку. Результатами дослідження автором роботи доведено, що за виразністю протинабрякової активності протягом першої години ГЕМД не поступається препарату порівняння диклофенаку натрію, інгібітору ліпооксигенази кверцетину, антигістамінному препарату лоратадину.

Враховуючи отримані результати, можна зробити висновок що досліджуваний екстракт пригнічує як медіатори ранньої фази запального процесу (гістамін, серотонін, кінініни) так і пізньої (ІІГ, оксид азоту) та не поступається ефективності диклофенаку натрію та кверцетину.

Розділ 5 Дослідження ефективності екстракту трави маруни дівочої на моделі ад'ювантного артрити у щурів

Враховуючи попередні результати досліджень протизапальної дії ГЕМД, Інною Володимирівною вивчено протизапальна активність екстракту системної дії на моделі ад'ювантного артрити. Результати свідчать, що досліджуваний ГЕМД проявив антиексудативну дію на високому рівні – 32 %, ефективність препарату порівняння диклофенаку натрію була 33 %, знижував маркери системного запалення (лейкоцитів, СРБ, ШЗЕ на 28 добу до рівня інтактних тварин, окрім СРБ- підвищено у 2,8 разу у порівнянні з інтактною групою). При дослідженні маркерів запалення сполучної тканини дисертантом встановлено, що за застосування ГЕМД вміст сіалових кислот достовірно знизився (у 1,9 разу) порівнянно з контрольною патологією, а рівень лужної фосфатази знизився до рівня інтактних тварин, що вказувало на уповільнення розпаду сполучної тканини. Проте у групі тварин, яким вводили диклофенак натрію, вміст цих показників хоча й був статистично значуще нижчим за такий у групі тварин контрольної патології, але залишався достатньо високим.

Отриманими результатами І.В. Кириченко обгрунтовано наявність хондротоксичної дії неселективних інгібіторів ЦОГ, зокрема диклофенак натрію.

За ефективністю ГЕМД у дозі 50 мг/кг не поступався препарату порівняння диклофенаку натрію, що обумовлює його перспективність для подальших досліджень як ефективного протизапального засобу.

Модель ад'ювант-індукованого артрити для якої характерна імунна відповідь з активацією Т-хелперів -1-го типу і призводить до підвищення рівня прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-17А, ІЛ-21. Блокада яких покращує течію захворювання у тварин з ад'ювант-індукованим артритом, що підтверджує роль цих цитокінів в патогенезі експериментального артрити.

Авторкою роботи дослідженнями встановлено, що ГЕМД у дозі 50 мг/кг сприяло нормалізації цитокінового профілю: вміст ІЛ-1 β знижувався у 1,8 разу, а ФНП- α – у 2,2 разу щодо значень контрольної патології. Одночасно з цим, рівень ІЛ-10 підвищувався до значень інтактних тварин і як наслідок зазначених змін, знижувався вміст ЦК та СРБ.

Позитивна динаміка вивчених показників за застосування ГЕМД свідчить про зменшення виразності патологічного системного запального

процесу. Препарат порівняння поступався ГЕМД за показниками СРБ та ЦК (на рівні контрольної патології).

Морфологічні дослідження довели, що ГЕМД сприяв зниженню кількості тварин із деструкцією суглобового хряща у 2,6 рази порівняно з контрольною патологією та кількості тварин із вираженим запальним процесом у синовіальній оболонці та періартикулярних тканинах у 3 рази.

За ефективністю ГЕМД не поступається референс-препарату диклофенаку натрію. Який повністю запобігав розвитку деструктивно-дистрофічних процесів хрящової тканини у 100% тварин. У 83,3% спостережень спостерігалось відсутність ознак синовіту.

Розділ 6 Дослідження токсикодинаміки гідрофільного екстракту трави маруни дівочої

Застосування більшості фітозасобів вважається відносно безпечним, але складний комплекс БАР, які визначають не тільки терапевтичну ефективність також може стати чинником виникнення небажаної реакції.

Оцінку безпечності фітопрепаратів проводять за допомогою вивчення різних видів токсичності на тваринах та інші види їх небажаної можливої дії.

Тому, враховуючи, що НПЗЗ, викликають негативні реакції з боку шлунково-кишкового тракту, то безумовно вивчення впливу ГЕМД на стан слизової оболонки та секреторну функцію шлунку і параметри його гострої токсичності стало логічним у ланцюгу досліджень дисертанта.

Авторкою роботи доведено, що ГЕМД у дозі 5000 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні не викликає загальної інтоксикації, не впливає на поведінку тварин, не подразнює слизову оболонку шлунку, за бальною системою склала 0,67, що в 4,9 разу було достовірно нижчим за тварин з контрольної групи, що відповідає зниженню ступеня виразкового пошкодження шлунку на 80% порівняно з контролем. І на підставі цього ГЕМД було віднесено до V класу токсичності ($LD_{50} > 5000$ мг/кг) – практично нетоксичні речовини.

ГЕМД недостовірно щодо контролю підвищував на інтенсивність виділення шлункового соку (на 11%) та загальну кислотність (на 5%) не порушуючи фракційний склад кислотності.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» здобувачем надано науково ґрунтовний аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження у порівнянні з контрольною патологією та референс-препаратами. Кириченко І.В. логічно підбиває підсумок наукової роботи, обґрунтовує висновки відповідно до поставлених задач дослідження, дисертаційна робота носить завершений характер.

Робота завершується 7 висновками, які відповідають поставленій автором меті та завданням дослідження.

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

Повнота викладу наукових положень дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, в яких відображені в повній мірі основні результати досліджень. Зокрема 6 статей у фахових виданнях, 1 патент України на корисну модель, 6 тез доповідей.

Зауваження, що стосуються оформлення і змісту дисертації

1. В обсязі і структурі дисертації, дисертанткою вказано 5 розділів власних досліджень (стор. 26), в дійсності – 4 розділи власних досліджень.
2. Кириченко І.В не надано обґрунтованого практичного значення її дисертаційної роботи, окрім впровадження в науково-педагогічний процес кафедр ВНЗ, тому Інна Володимирівна повинна довести практичну значимість, бо робота має суттєвий внесок не тільки у розвиток науки але практики.
3. Якщо б дисертанткою було представлено Алгоритм проведеного дослідження у схемі, це тільки б прикрасило роботу.
4. Назва препарату диклофенак натрію зустрічається в роботі і з великої букви в лапках, і з маленької буки без лапок, не прослідковується витриманого стилю написання назви лікарських препаратів.
5. У назві 6 розділу дослідження токсикодинаміки, та у назві 6.2. підрозділу дисертантом надано гідрофільний екстракт маруни дівочої в назвах табл. 6.2, табл. 6.3, вже - густий екстракт пижми дівочої, хоча у списку скорочень надано, що ГЕМД-це **гідрофільний** екстракт маруни дівочої, окрім того, що густим екстрактом у роботі є і ліпофільний. Потрібно у написанні назв і скорочень дотримуватися відповідності.

Запитання

1. Якими механізмами можна пояснити наявність центральної анальгетичної дії ГЕМД.
2. ГЕМД в дослідженні його токсикодинаміки проявив позитивний вплив на стан сливової оболонки шлунково-кишкового тракту, чи була у Вас думка дослідити противиразкову дію ГЕМК на відповідних моделях.

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

Дисертаційна робота Кириченко Інни Володимирівни за темою «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей екстракту з трави маруни дівочої» є завершеною науковою роботою, яка містить науково

обґрунтовані результати вирішення питань системного підходу до вивчення густих екстрактів трави маруни дівочої (ліпофільного та гідрофільного) та обґрунтуванні щодо фармакологічної активності гідрофільного екстракту маруни дівочої.

Що відповідає завданням сучасної фармації щодо вивчення лікувальних властивостей відомих рослин, розробки нових та вдосконалення існуючих фітопрепаратів багатогранної дії в лікуванні запальних захворювань.

Висновок. Дисертаційна робота Кириченко Інни Володимирівни засвідчує достатній науковий підхід в оволодінні різними методами дослідження, аналізу, обізнаність із літературними джерелами відповідної тематиці, вміння узагальнювати накопичений матеріал, формулювати узагальнюючі висновки.

Таким чином, за актуальністю, науковою новизною, практичним значенням, робота Кириченко Інни Володимирівни за темою «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей екстракту з трави маруни дівочої» відповідає вимогам Постанови КМ України №44 про Порядок присудження ступеня доктора філософії, а дисертантка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Офіційний опонент:

Завідувачка кафедри фармакології та медичної рецептури
Харківського національного медичного університету МОЗ України,
доктор фармацевтичних наук,
професор



A handwritten signature in black ink, appearing to be "T. I. Ermolenko", written over the official stamp.

Т. І. Єрмоленко