

ВІДГУК

офіційного опонента, професора кафедри фармації Львівської медичної академії ім. А. Крупинського, доктора фармацевтичних наук, професора Цубанової Наталі Анатоліївни на дисертаційну роботу Кириченко Інни Володимирівни «ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ МАРУНИ ДІВОЧОЇ», представлену до спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.71 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України, що 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 теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у розвинених країнах біль за поширеністю порівнюють із пандемією. Так у звіті Global Pain Index Report 4th edition 2020 зазначено, що 32 % людей у всьому світі відчувають біль як мінімум один раз на тиждень, 74 % оцінюють біль як інтенсивний. Больовий синдром є причиною звернень пацієнтів у 52% усіх випадків надання невідкладної медичної допомоги, зокрема на первинному рівні. Значне збільшення пацієнтів із больовим синдромом реєструється у останні 2-3 роки, через те, що за даними сучасних клінічних досліджень, метааналізів (Lopez-Leon S. із співавт. 2021; Michelen M. із співавт. 2020; Hoshijima H. із співавт. 2021; Kamal M. із співавт. 2021 та ін) у 30-40 % постковідних пацієнтів реєструється больовий синдром de novo.

Для переважної більшості пацієнтів, за даними Chan E.S. (2021), больовий синдром поєднується із реакцією запалення, що потребує застосування нестероїдних лікарських засобів (НПЗЗ) і/або ненаркотичних анальгетиків (ННА). Вищезазначені групи препаратів наряду із потужною протизапальною та анальгетичною активністю мають низку побічних ефектів то протипоказань.

На сьогоднішній день до груп НПЗЗ входять близько 100 оригінальних молекул. Всі вони характеризуються дуже подібним, механізмом дії пов'язаним із інгібуванням ЦОГ 2 та ЦОГ 2, який має різницю за селективністю впливу на форми ферменту; відповідно схожу фармакодинаміку і показання до застосування – переважно, для симптоматичної терапії больового синдрому та/або запальної реакції.

Відомо, що лікування 85% захворювань передбачає застосування НПЗЗ, саме через наявність больового синдрому та/або запальної реакції; щодня понад 30 мільйонів людей в світі приймають НПЗЗ, 40% з них – пацієнти, старші за 60 років (тобто найбільш уразлива до дій цих препаратів група)

Найбільш частими побічними ефектами при застосуванні НПЗЗ є розвиток гастротоксичності, гепатотоксичності, підвищення кардіоваскулярних ризиків та нефротоксичність, що може значно обмежити можливості їх застосування особливо для пацієнтів старшої вікової групи (60+), дітей та вагітних.

Доцільність створення препаратів із протизапальною та аналгетичною дією із принципово новим механізмом дії, меншими ризиками розвитку побічних ефектів є клінічною необхідністю.

Перспективним об'єктом з фармакологічної точки зору є лікарська рослинна сировина, екстракти Маруни дівочої (*Tanacetum parthenium L.*) які за вмістом біофлавоноїдів можуть мати протизапальну та знеболюючу активність.

Створення вітчизняного лікарського засобу на протизапальною дією на основі екстракту Маруни дівочої (*Tanacetum parthenium L.*) є актуальним для сучасної фармації та медицини.

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

Дисертацію виконано за планом затвердженої МОЗ України науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету “Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів” (номер держреєстрації 0103U000478), в якій дисертант є співвиконавцем

Обсяг та структура дисертації

Матеріали дисертації викладено на 172 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 302 посилання, з них 32 кирилицею та 270 латиницею. Робота ілюстрована 19 рисунками та 14 таблицями.

Основний зміст дисертації та його оцінка

Вступ характеризується загальноприйнятим порядком викладення матеріалу. Дисертант спочатку характеризує актуальність обраної теми, про що свідчать посилання літератури, які підтверджують доцільність створення нових лікарських форм зі протизапальною активністю на основі лікарської рослинної сировини екстракту Маруни дівочої. У вступі автором сформульовано мету та задачі дослідження, наведено наукову новизну, практичне значення отриманих результатів та інформацію щодо публікацій та апробації результатів досліджень.

Огляд літератури висвітлює патофізіологічні механізми запалення, болю та сучасні підходи до їх фармакотерапії. Наведені дані, щодо класифікації НПЗЗ за їх селективністю по відношенню до ЦОГ1 та ЦОГ 2. Проаналізовані основні види побічних реакцій за умов застосування НПЗЗ.

Доведено, що лікарські засоби на основі рослинної сировини можуть бути застосовані у терапії запалення та болю. Перспективним у цьому аспекті є дослідження рослин, що належать до родини Anacardiaceae, через наявність таких БАР, як: феноли, тритерпени, флавоноїди та коричні кислоти.

Проаналізовані механізми протизапальної дії вищезазначених БАР, що включають антиоксидантну та антирадикальну активність, регуляцію тучних клітин, макрофігів, нейторофілів, інгібування фосфоліпази А2, циклооксигеназ, ліпоксигеназ і синтази оксиду азоту, вплив на ядерний фактор κВ (NF-κВ).

Досить детально у третьому підрозділі дисертант характеризує БАР *Tanacetum parthenium L.*, а саме групу сесквітерпенових лактонів. Так, наприклад, для партеноліду встановлено протизапальну активність на моделі карагенінового набряку у щурів і мишей, механізм дії якої реалізується у зниженні NF- κ B та цитокінів IL-1 β , IL-6 на ранній фазі запалення. Доведена аналгетична дія партеноліду у тесті корчів. З інших джерел екстракт маруни дівочої містить похідні кофеїлу, включаючи хлорогенову кислоту (12%), 3,4-ді-О-кофеїлхінову кислоту (23,33%) і 3,5-ді-О-кофеїлхінову кислоту (31,78% разом з спільно елюйованим апігенін-7-О-глюкуронідом).

У розділі «**Матеріали та методи дослідження**» автор досить детально описує всі використані фармакологічні, імуноферментні, токсикологічні, гістологічні, біохімічні методи дослідження та методи математичної статистики та планіметрії.

Об'єктом дослідження були екстракти маруни дівочої (*Tanacetum parthenium L.*) трави екстракти густі: ліпофільний (хлороформний) – ЛЕМД та гідрофільний (водно-спиртовий) – ГЕМД.

Експериментальні дослідження проведені на білих мишах та безпорідних білих щурах. Аналіз морфометричних показників у щурів із ад'ювантним артритом проводили вимірюванням товщини хряща на мікропрепаратах за допомогою програми *Top View*.

Біотичні аспекти досліджень схвалені комісією з питань біоетики НФаУ (протокол № 6 від 25.06.2021 р.).

Статистична обробка фактичного матеріалу проведена адекватними методами. Використання сучасної методології досліджень свідчить про високий методичний рівень роботи.

Результати власних досліджень наведені автором в 4 експериментальних розділах.

У третьому розділі дисертант приводить результати скринінгових досліджень аналгетичної активності ЛЕМД та ГЕМД.

Діапазон доз досліджуваних екстрактів складав від 25 мг/кг до 100 мг/кг, що дозволило встановити дозозалежну дію екстрактів та встановити що максимальну анальгетичну активність у тесті «Гаряча пластина» чинить ЛЕМД у дозі 50 мг/кг та ГЕМД у дозі 50 мг/кг.

У тесті «Оцтовокислі корчі» підтверджено значну протибольову дію ЛЕМД у дозі 50 мг/кг та ГЕМД у дозі 50 мг/кг.

Четвертий розділ присвячено дослідженню протизапальної дії екстрактів маруни дівочої за умов експериментальних запальних реакцій різного генезу.

На моделі гострого зимозанового запалення дисертантом доведена значна антиексудативна активність ГЕМД з 1 по 24 години експерименту та незначна антиексудативна дія ЛЕМД, що стало підставою для подальшого дослідження ГЕМД у дозі 50 мг/ кг.

На моделі карагенінового набряку дисертантом встановлено, що на ранніх стадіях запалення під впливом ГЕМД максимальний антексудативний ефект становив 71-78 %, при чому не поступався в цей період НПЗЗ диклофенаку натрію.

За умов гістамінового запалення також продемонстрована потужна протизапальна активність ГЕМД у дозі 50 мг /кг на рівні препаратів порівняння диклофенаку натрія, кверцетину та лоратадину.

Таким чином дисертантом на моделях запалення різного генезу переконливо доведена протизапальна дія ГЕМД у дозі 50 мг/кг.

У п'ятому розділі висвітлені результати дослідження ефективності ГЕМД у дозі 50 мг/кг за умов експериментального ад'ювантного артриту (АДА) у щурів. АДА клінічно виявлявся у вигляді еритематозного набряку ураженої лапи у щурів. Введення ГЕМД дозволило значно знизити виразність набряку.

Системний характер АДА підтверджують зміни на 14 та 28 добу дослідження швидкості зсідання еритроцитів (ШЗЕ), концентрацію лейкоцитів, вміст С-реактивного білка (СРБ), рівні інтерлейкінів (ІЛ-1 β , ІЛ-10, ФНП- α), які вимірювали на імуноферментному аналізаторі та вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), активність лужної фосфатази, рівень сіалових кислот.

Тварини, що отримували ГЕМД у дозі 50 мг/кг мали статистично значущі відмінності за всіма досліджуваними показниками відносно групи контрольної патології, що підтверджує значну системну протизапальну дію екстракту маруни дівочої.

Особливо слід відзначити нормалізуючий вплив ГЕМД на імунологічні показники (ІЛ-1 β , ІЛ-10, ФНП- α) та ЦК.

Підтвердженням протизапальної дії екстракту маруни дівочої є наведені дисертантом результати гістологічних досліджень гомілковостопних суглобів щурів із АДА. 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.

Автором переконливо доведена протизапальна дія ГЕМД.

Шостий розділ присвячено вивченню токсикологічного профілю ГЕМД.

Вивчено показник гострої токсичності за умов введення ГЕМД у дозі 5000 мг/кг.

Автором, також встановлено, що ГЕМД у дозі 50 мг/кг певною мірою підвищував інтенсивність виділення шлункового соку (на 11%) та загальну кислотність шлункового соку (на 5%), але недостовірно щодо інтактного контролю. ГЕМД не чинить негативної дії на стан слизової оболонки шлунка.

Таким чином, густий екстракт маруни дівочої є перспективною безпечною рослинною субстанцією для створення нових лікарських засобів з відсутнім пошкоджуючим впливом на стан слизової оболонки шлунка.

Аналіз та узагальнення результатів викладені у відповідності з послідовністю завдань роботи та окремих розділів дослідження. Автор у повній мірі володіє сучасними знаннями з наукової проблеми вдосконалення та оптимізації топічної терапії ранової поверхні. Отримані результати грамотно проаналізовані. Логічний стиль викладу аналізу результатів, дозволив автору систематизувати отриманий матеріал і зробити науково обґрунтовані висновки, які відповідають поставленій меті і завданням дисертаційної роботи.

Список використаних джерел літератури містить 302 посилання, що оформлені відповідно до чинних вимог, 79,5 % із наведених писилань датовано останніми 10 роками.

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

Дисертація Кириченко І. В. виконана на високому науковому рівні із використанням сучасних методів фармакологічних, імунологічних, токсикологічних, гістологічних та біохімічних досліджень, достатньої кількості лабораторних тварин та методик та визначенням інформаційних показників. Достатня кількість фактично отриманих показників оброблена із використанням 6 статистичних методів, що дало змогу адекватно оцінити як параметричний, так і не параметричний розподіл вибірки. Достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів. Експериментально отримані показники наведені у вигляді таблиць, рисунків та графіків. Наукові положення і висновки дисертаційної роботи засновані на методичних принципах, що відповідають поставленим завданням, є теоретично і експериментально обґрунтованими і логічно впливають з отриманих результатів. Теоретичні припущення, що робить автор та висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і цілком відображають встановлені закономірності, що були з'ясовані під час експериментальних досліджень.

Зазначене дає підставу вважати, що наукові положення та висновки дисертаційної роботи Кириченко І. В. є повністю обґрунтованими, узгодженими з метою і завданнями дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів

У роботі теоретично обґрунтовано та експериментально доведено перспективи впровадження нового оригінального лікарського препарату на основі екстракту маруні дівочої у як ефективного протизапального та анальгетичного засобу.

Вперше проведено скринінгове дослідження ліпофільного (ЛЕМД) та гідрофільного (ГЕМД) екстракти трави маруні дівочої (*Tanacetum parthenium*

L.) за показником аналгетичної активності в тесті «Гаряча пластина» та на моделі «Оцтовокислі корчі» та доведено, що максимальна активність екстрактів характерна для дози 50 мг/кг.

Поглиблені скринінгові дослідження на моделі зимозанового набряку дозволили дисертанту обрати ГЕМД у дозі 50 мг/кг для подальших поглиблених досліджень протизапальної та аналгетичної дії.

За результатами проведених досліджень, автором доведено, що на моделях гострого карагенінового набряку та гістамінового набряку ГЕМД у дозі 50 мг/кг не поступався препаратам порівняння диклофенаку натрію, кверцетину та лоратадину.

На моделі ад'ювантного артриту у щурів, дисертантом вперше встановлено, що ГЕМД чинив потужну протизапальну дію, що верифікована за клінічними (величина набряку лапи) та біохімічними (ШЗЕ, лейкоцити, лужна фосфатаза та ін.) показниками.

Дисертантом встановлено, що у механізмі протизапальної дії ГЕМД важлива роль належить імунокоригувальним властивостям, про що свідчить нормалізація цитокінового профілю: зниження вмісту прозапальних цитокінів: ІЛ-1 β – у 1,8 разу, ФНП- α – у 2,2 разу, підвищення рівня протизапального цитокіну ІЛ-10 в 1,6 разу, зниження рівня циркулюючих імунних комплексів в 1,6 разу в порівнянні із групою контрольної патології.

Дисертантом вперше проведено вивчення токсикологічного профілю ГЕМД. Встановлено, що досліджуваний об'єкт має перспективи у подальшому клінічному використанні через низьку токсичність (ЛД₅₀ > 5000 мг/кг, належить до V класу токсичності) та відсутність гастротоксичних проявів.

Таким чином, вперше встановлено, що гідрофільний екстракт маруни дівчої є перспективною безпечною рослинною субстанцією для створення нових лікарських засобів з виразними аналгетичними та протизапальними властивостями. Новизна підтверджена патентом України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів

Результати проведених досліджень обґрунтовують доцільність створення вітчизняного оригінального засобу із протизапальною та аналгетичною дією основі екстракту маруні дівочої.

Результати роботи впроваджені у науково-педагогічний процес чотирьох кафедр Закладів вищої освіти України (Дніпровський державного медичного університету, Полтавський державний медичний університет, Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського, Івано-Франківський національний медичний університет).

Повнота викладу наукових положень дисертації в опублікованих працях

Матеріали дисертаційної роботи опубліковані у 6 статтях, які розміщені у фахових виданнях України та закордонних. Основні положення дисертації оприлюднені на 6 наукових форумах різного рівня, відповідно опубліковано 6 тез доповідей.

Зауваження, що стосуються оформлення і змісту дисертації та анотації

Суттєвих недоліків в дисертаційній роботі та анотації не виявлено. Робота повністю відповідає сучасним вимогам щодо структури, змісту та технічного оформлення. Існують деякі недоліки та дискусійні моменти:

1. Було б доцільно конкретизувати назву дисертаційної роботи у відповідності до мети дослідження, наприклад «Фармакологічна корекція запальних процесів різного генезу екстрактом *Tanacetum parthenium L.*».
2. В огляді літератури не наведено сучасні дані щодо сучасних поглядів на механізм дії НПЗЗ, наприклад їх вплив на серотонінергічні нейрони у ЦНС, та блокуванням NMDA рецепторів. Також бажано було проаналізувати ад'ювантні лікарські засоби які мають суттєвий модулюючий вплив на біль та/або можуть потенціювати дію аналгетиків або зменшувати виразність їхніх побічних ефектів (антидепресанти, антигістамінні, анксиолітики тощо).

3. Аналіз отриманих результатів, щодо анальгетичної дії ЛЕМД ТА ГЕМБ із розділу 3 (с.69-71) доцільно перенести у розділ «Аналіз та обговорення результатів».
4. В розділі «Матеріали та методи» доцільно було вказати розмір циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які досліджували.
5. Заявлена у огляді літератури дисертантом антиоксидантна дія БАВ екстрактів маруни, не знайшла підтвердження у експериментальній частині. Дослідження впливу екстракту на баланс ПОЛ-АОС дозволило б більш повно порозуміти механізм протизапальної дії, особливо на моделі експериментального ад'ювантного артриту.
6. Подекуди зустрічаються граматичні помилки.

Наведені зауваження принципово не змінюють оцінку дисертаційної роботи.

У плані дискусії хотілося б почути думку дисертанта з наступних питань:

1. В огляді літератури, переконливо доведено, що найбільш дослідженим БАВ маруни дівочої є сесквітерпеновий лактон партенолід, для якого наведено 21 дослідження (№№160-180), що підтверджують його потужну протизапальну та анальгетичну активність, із доведеною здатністю знижувати цитокіни, ЦОГ-2, індукцибельну NO-синтазу та ін. Саме партенолід, як зазначено у розділі «Матеріали та методи» є основною БАВ за яким стандартизують ЛЕМД. Поясніть, чому у тесті зимозанового набряку ЛЕМД із високим вмістом партеноліду поступався у 2 рази за антиексудативною активністю ГЕМД, що містить звичайні флавоноїди, як і кверцетин?
2. ЛЗ із протизапальною дією на основі біофлавоноїдів, як відомо, ефективно впливають на перші години гострого запалення (з 30 хв до 2 годин), коли є надмірне вироблення біогенних амінів та підвищена активність ліпооксигенази. Поясніть, за рахунок чого, за умов каргенінового набряку ГЕМД, стандартизований за вмістом флавоноїда гіперозида та гідроксикоричних кислот демонструє активність на 3 годину запалення (активність ЦОГ 2, вироблення запальних простагландинів) на рівні диклофенаку натрія (с. 77-78) класичного інгібітора ЦОГ.

Висновки

Дисертація Кириченко Інни Володимирівни «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей екстракту з трави маруни дівочої» є закінченою, самостійною науково-дослідною роботою.

Дисертаційна робота містить науково обґрунтовані положення з фармакології, що в сукупності становлять суттєвий внесок до вирішення актуального науково-практичного завдання фармакології, що полягає у розробці та дослідженні нових протизапальних засобів на основі рослинної сировини.

Дисертація засвідчує достатній науковий рівень дослідника, володіння експериментальними фармакологічними методиками, методами проведення біохімічних, імунологічних та ін. особливо слід відзначити вміння дисертанта аналізувати отриманий фактичний матеріал, у тому числі із використанням різних методів статистичного аналізу.

За актуальністю, науковою новизною, практичним значенням, а також обсягом досліджень, дисертаційна робота Кириченко Інни Володимирівни «Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей екстракту з трави маруни дівочої» відповідає вимогам Постанови КМ України №44 «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження доктора філософії», а дисертант заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» .

Офіційний опонент

Професор кафедри фармації

Львівської медичної академії ім. А. Крупинського,

доктор фармацевтичних наук,

професор



Н.А. Цубанова