

ВІДГУК
офіційного опонента
доктора фармацевтичних наук, професора Грицика Андрія Романовича
на дисертаційну роботу Лисюка Романа Миколайовича
на тему «Фармакогностичне дослідження видів лікарських рослин з
нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю»
на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук
за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми.

На сьогодні асортимент вітчизняних гіпоазотемічних лікарських засобів є досить обмеженим, що свідчить про необхідність пошуку і розробки нових препаратів на основі доступної рослинної сировини з достатньою сировинною базою.

Актуальним є фітохімічне та фармакологічне дослідження видів роду Астрагал, в т.ч. гіпоазотемічної активності, враховуючи достатню ресурсну базу неофіціальних видів, можливість інтродукції, що свідчить про обґрунтованість і актуальність дослідження.

Дисертаційна робота Лисюка Р.М. присвячена пошуку і комплексному фармакогностичному вивченню видів лікарських рослин флори України з потенційною нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю.

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану Проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної наукової роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького за темою «Синтез та перетворення нових фізіологічно-активних речовин – похідних неконденсованих, конденсованих і макрогетероциклічних азолідонів і споріднених гетероциклічних систем, з використанням методів віртуального синтезу, вивчення фізико-хімічних властивостей та проведення фармакологічного скринінгу одержаних сполук, дослідження різних видів рослин Прикарпатської флори з метою одержання нових лікарських засобів, розробка технології лікарських форм нових складів та опрацювання сучасних

методик фармацевтичного та токсикологічного аналізу” (№ державної реєстрації 0111U010499). Шифр теми ІН 10.06.0001.16.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, їх достовірність.

При вирішенні поставлених у дисертації завдань дисертантом було використано як традиційні, так і сучасні методи досліджень: морфологічні, органолептичні і анатомічні – опис, ідентифікація, стандартизація сировини; фізико-хімічні – тонкошарова хроматографія (ТШХ), вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), ВЕРХ з УФ-детектуванням; газорідинна хроматографія – мас-спектрометрія (ГРХ-МС), атомно-абсорбційної спектрофотометрія з електротермічною атомізацією (ААС/ЕА), спектрофотометрія (СФ) в УФ- та видимих областях спектрів; фармакологічні *in vivo*– нефропротекторна й гіпоазотемічна дія за стандартними методиками; статистичні – дослідження кореляції і обробка результатів експерименту.

Наукові положення дисертації та висновки обґрунтовані і логічно витікають з результатів власних досліджень.

Матеріал, наведений у дисертаційній роботі Лисюка Р.М., є перспективним для впровадження у практичну медицину та фармацію.

Наукова новизна отриманих результатів.

Дисертантом вперше проведено комплексний пошук перспективних сировинних джерел флори України з нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю на основі принципів фітохімічного скринінгу.

Вперше проведено комплексне фармакогностичне вивчення вітчизняної сировини трави астрагалу солодколистого, досліджено якісний склад і кількісний вміст БАР сировини; методами ТШХ та ВЕРХ за хроматографічним профілем ідентифіковано флавоноїди, катехіни й гідроксикоричні кислоти; методом ААС/ЕА кількісно визначено вміст мікроелементів у складі трави астрагалу солодколистого.

Уперше у процесі дослідження виявлено та описано, відповідно до вимог ДФУ, діагностичні ознаки трави астрагалу солодколистого та визначено критерії стандартизації даної сировини.

Дисертантом вперше розроблено і апробовано методику кількісного визначення суми флавоноїдів у надземних органах астрагалу солодколистого методом УФ-спектрофотометрії.

Розроблено склад комплексного рослинного засобу гіпоазотемічної дії ДД Фіточай «Нефропротектол», до якого запропоновано компоненти: квітки робінії звичайної, листя і квітки глоду, листя берези і трава споришу.

Вперше встановлено гіпоазотемічну активність сумарних рідких екстрактів з надземних органів астрагалу солодколистого, астрагалу серпоплодного і астрагалу козлятникоподібного, а також розробленої ДД Фіточай «Нефропротектол».

Для трави астрагалу солодколистого і добавки дієтичної Фіточай «Нефропротектол» опрацьовано критерії стандартизації за органолептичними властивостями, числовими показниками якості та кількісним вмістом основних БАР.

Дисертантом обґрунтовано і експериментально підтверджено розроблену «Концептуальну модель пошуку і розробки нових рослинних засобів з нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю».

Наукову новизну досліджень підтверджено інформаційним листом № 72 «Морфологічні та анатомічні ознаки трави астрагалу солодколистого», рекомендованого до видання Експертною проблемною комісією «Фармація» МОЗ та НАМН України (протокол № 109 від 10 березня 2020 р.).

Практичне значення одержаних результатів.

Результати фармакогностичного та фармакологічного дослідження трави астрагалу солодколистого, астрагалу козлятникоподібного і астрагалу серпоплодного, а також ДД Фіточай «Нефропротектол» свідчать про можливість використання ЛРЗ на їх основі у практичній медицині.

Дисертантом за результатами досліджень розроблено проекти МКЯ на «Астрагалу солодколистого траву» і добавку дієтичну Фіточай «Нефропротектол».

На добавку дієтичну Фіточай «Нефропротектол» у співпраці з ПрАТ «Ліктрави» (м. Житомир) розроблено Технічні умови України ТУ У 10.8-00481181-013:2019 (змiна №1) «Дієтичні добавки «Фіточай».

Обґрунтовано «Концептуальну модель пошуку і розробки нових рослинних засобів з нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю», яка є алгоритмом для опрацювання та впровадження нових лікарських засобів (ЛЗРП) різної терапевтичної дії.

Результати дисертаційного дослідження щодо морфолого-анатомічної будови та хімічного складу сировинних органів астрагалу солодколистого, нефропротекторної (гіпоазотемічної) активності перспективних видів лікарських рослин, впроваджено в навчальний процес та науково-дослідну роботу ЗВО України:

Особистий внесок здобувача.

Дисертанту належить вирішальна роль у визначенні мети, завдання та методів проведення досліджень. Дисертантом особисто проведено інформаційно-патентний пошук за темою дисертаційної роботи; досліджено зразки сировини астрагалу солодколистого за макро- і мікроскопічними ознаками; проведено дослідження якісного складу і кількісного вмісту основних груп БАР аналізованої сировини та запропоновано підходи до стандартизації; розроблено проєкти МКЯ на «Астрагалу солодколистого траву» і ДД Фіточай «Нефропротектол»; проаналізовано та систематизовано результати дослідження нефропротекторної й гіпоазотемічної активності екстрактів трави астрагалу солодколистого, трави астрагалу серпоплодного і трави астрагалу козлятникоподібного, ДД Фіточай «Нефропротектол»; проведено статистичну обробку даних; написано розділи дисертації, сформульовано висновки.

Повнота викладу матеріалів дослідження в опублікованих роботах.

За матеріалами дисертації опубліковано 43 наукові праці, зокрема 17 статей, з них 2 статті у міжнародних наукових виданнях, індексованих у базі Scopus; 3 - у фахових виданнях; 1 – у науковому фаховому виданні Білорусі; 7

статтей, опублікованих у закордонних виданнях; 4 статті - у інших виданнях; 1 монографія, опублікована закордоном; 25 тез доповідей.

Результати досліджень пройшли апробацію на наукових конференціях різних рівнів та впроваджені у навчальний процес кафедр фармацевтичного профілю ЗВО України.

Аналіз дисертаційної роботи.

Дисертаційну роботу викладено на 221 сторінках машинописного тексту, вона складається з анотації, вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить розділ з описом об'єктів і методів дослідження та чотири розділи з результатами експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 221 сторінку. Дисертацію ілюстровано 42 рисунками, 17 таблицями. Список використаних джерел містить 267 публікацій, з яких 120 кирилицею та 147 латиною.

Анотація дисертаційної роботи оформлена згідно до вимог наказу № 40 МОН України від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

У *вступі* автор обґрунтовує актуальність обраної теми дослідження, формулює мету та завдання досліджень, відзначає наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

Перший розділ присвячено аналізу фармацевтичного ринку України та складу ЛЗРП для лікування захворювань сечовидільної системи фармакотерапевтичної групи G04B «Засоби, що застосовуються в урології» Анатомо-терапевтично-хімічної класифікації ВООЗ; дисертантом визначено ТОП-10 ЛРС у складі лікарських засобів даної групи і проведено узагальнення даних щодо фармакологічних властивостей, які мають терапевтичне значення при ниркових захворюваннях.

Проаналізовано дані щодо особливостей гіпоазотемічної активності ЛРС, сумарних препаратів та індивідуальних сполук рослинного походження при порушеннях функціонування нирок. Проведено інформаційно-пошукові дослідження щодо хімічного складу видів ЛРС вітчизняної флори, які

виявляють нефропротекторну (гіпоазотемічну) активність. Здійснено теоретичне обґрунтування вибору для подальшого вивчення рослинних субстанцій, що містять активні речовини-маркери з гіпоазотемічною дією.

У **другому розділі** автор наводить дані щодо об'єктів, матеріалів та методів дослідження. Для досліджень використано сучасні фізичні, фізико-хімічні, хімічні, фармакогностичні, фармакологічні та статистичні методи.

У **третьому розділі** автором дисертації проведено вивчення морфолого-біологічних характеристик робінінвмісних видів роду Астрагал (*Astragalus (A.) galegiformis*, *A. falcatus*, *A. glycyphyllos*) і Леспедеца (*Lespedeza bicolor*), інтродукованих в умовах м. Львова.

У результаті проведеного аналізу встановлено макроскопічні ознаки трави астрагалу солодколистого, які ввійшли до МКЯ на сировину. Для стандартизації ЛРС проведено мікроскопічний аналіз трави астрагалу солодколистого.

У **четвертому розділі** висвітлено матеріали щодо проведеного дисертантом фітохімічного аналізу. Методами ТШХ і ВЕРХ вивчено склад та вміст флавоноїдів і гідроксикоричних кислот – маркерів гіпоазотемічної активності у фітосубстанціях, отриманих на основі рослинної сировини представників родини Бобові – астрагал солодколистий, астрагал серпоплодий і астрагал козлятникоподібний, робінія звичайна; вивчено хроматографічні профілі перспективних видів роду Астрагал.

Дисертантом вперше встановлено у траві астрагалу солодколистого (методом ВЕРХ з УФ-детектуванням) кількісний вміст галокатехіну, епігалокатехіну, епікатехіну, галової кислоти, катехіну, епікатехінгалату, а також вміст гідроксикоричних кислот: хлорогенової, кавової, *n*-кумарової, ферулової та розмаринової.

Автором визначено кількісний вміст макро- і мікроелементів у надземних органах астрагалу солодколистого, астрагалу серпоплодного і астрагалу козлятникоподібного. Досліджено вміст суми флавоноїдів та мікроелементів (феруму, цинку, мангану, купруму) трави астрагалу солодколистого, трави астрагалу козлятникоподібного, трави астрагалу серпоплодного, трави споришу,

листя і квіток глоду, листя берези. Встановлено кореляційний зв'язок між сумарним вмістом флавоноїдів та екстрагованого у настій мангану у листках з квітками глоду і траві споришу.

На основі проведених досліджень запропоновано аналітичну методику для визначення у траві астрагалу солодколистого сумарного вмісту флавоноїдів методом диференціальної спектрометрії у перерахунку на кверцетинудигідрат і рутину тригідрат. Встановлено, що 70 % етанол екстрагував найбільшу кількість флавоноїдів трави астрагалу солодколистого, що вказує на вміст флавонів і глікозидів флавонолів, які мають максимум поглинання за довжини хвилі від 385 до 395 нм і 410 - 412 нм відповідно.

П'ятий розділ присвячений дослідженню *in vivo* впливу сумарних екстрактів надземних органів астрагалу солодколистого, астрагалу козлятничкоподібного, астрагалу серпоплодного, розробленої дієтичної добавки Фіточай«Нефропротектол», на показники функції нирок щурів-самців з використанням моделі гострої сулемової нефропатії. Дані проведеного фармакологічного вивчення механізмів дії аналізованих екстрактів підтверджують їх виражену гіпоазотемічну дію.

У **шостому розділі** автором представлені результати досліджень щодо розробки складу засобу гіпоазотемічної дії, стандартизації трави астрагалу солодколистого і фіточаю «Нефропротектол».

Дисертантом опрацьовано критерії стандартизації сировини трави *A. glycyphyllos* за розділами «Ідентифікація А, В, С» та «Кількісне визначення», розроблено проєкт МКЯ на добавку дієтичну Фіточай «Нефропротектол» (макроскопічні ознаки, органолептичні показники, кількісні показники якості).

Дисертантом обґрунтовано «Концептуальну модель пошуку і розробки нових рослинних засобів з нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю.

Зауваження і пропозиції.

Робота Лисюка Р.М. відрізняється оригінальним підходом до проведення дослідження з використанням різних сучасних методів фітохімічного, фармакологічного та мікроскопічного дослідження тощо. Висновки, наведені автором, ґрунтуються на власному експериментальному матеріалі.

Проте поряд з позитивною оцінкою дисертаційної роботи Лисюка Р.М. є деякі зауваження та пропозиції.

В роботі зустрічаються технічні та орфографічні помилки, невдалі або не точні вислови (наприклад, рясне цвітіння (стор. 67), раннє цвітіння (стор.71) тощо).

Розділ 3.1. Дослідження морфо-біологічних характеристик інтродукованих робінінвмісних видів. Наскільки підтвердженою є інформація, що для «...сировинного забезпечення фармації характерна недостатня кількість вітчизняної сировини рослинного походження». Розділ також вміщує значну кількість інформації про розповсюдження видів з різних літературних джерел.

Розділ 3.2. Вивчення морфологічних ознак надземних органів астрагалу солодколистого, стор. 105. Вказано «...при складанні проєктів МКЯ...», а наведено тільки один проєкт МКЯ «Трава астрагалу солодколистого».

На рис. 4.9 в назві вказано «УФ-спектри суміші стандартів катехинів та галової кислоти при 280 нм», а наведено УФ-спектр окремих катехинів та галової кислоти в діапазоні від 220 нм до 320 нм.

В розділі 4.1. Виявлення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот методом ТШХ (рис. 4.1) наведено результати ТШХ флавоноїдів та гідроксикоричних кислот трави астрагалу солодколистого та серпоплодного. Чим можна пояснити суттєву відмінність в хімічному складі досліджуваних видів?

В розділі 4.2, 4.3 наведено результати дослідження флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, катехинів і галової кислоти. Які речовини є маркерами для видів астрагалу?

Розділ 4.6 (табл. 4.4). Чим Ви можете пояснити значний вміст мікроелементів у видах астрагалу, наприклад, Mn – 162 – 568 мг/100 г, Zn – 101 – 142 мг/100 г. Чим можна пояснити значні коливання Mn в досліджуваних видах астрагалу та відмінності в результатах вмісту мікроелементів з даними інших авторів?

Вами запропоновано фіто чай «Нефропротектол» як засіб нефропротекторної (гіпоазотемічної) активності, обґрунтовано вибір

компонентів збору. Які експериментальні або емпіричні дані дозволили встановити співвідношення компонентів робіни звичайної квітки : глоду листя і квітки : берези листя : споришу трава – 40 : 20 : 20 : 20.

Окремі компоненти збору стандартизують за вмістом гіперозиду – глоду листя і квіти (не менше 1,5 %), берези листя (не менше 1,5 %), споришу трави (не менше 0,3 %). Чим обґрунтовано стандартизацію фітозбору за вмістом флавоноїдів (не менше 1,5 % в перерахунку на гіперозид)?

Наведені зауваження не мають принципового характеру і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Положення.

Дисертаційна робота Лисюка Романа Миколайовича на тему «Фармакогностичне дослідження видів лікарських рослин з нефропротекторною (гіпоазотемічною) активністю» є закінченою науковою працею, у якій одержано дані, що є суттєвими у вирішенні проблеми пошуку та дослідження лікарських рослин з метою створення нових лікарських засобів на їх основі для профілактики та лікування захворювань нирок. Дана робота за актуальністю, теоретичним і практичним значенням, використанням сучасних методів і підходів у експериментальних фітохімічних, фармакогностичних і фармакологічних дослідженнях, за обсягом проведених досліджень повністю відповідає вимогам п. п. 9, 10, 11 «Порядку присудження наукових ступенів» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2017р., зі змінами), а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Завідувач кафедри фармації

Івано-Франківського національного
медичного університету

доктор фармацевтичних наук, професор



Грицик А.Р.

Підпис
Прізвище