

Відгук
офіційного опонента
на дисертаційну роботу
ДОБРОВОЛЬНОГО ОЛЕКСАНДРА ОЛЕКСАНДРОВИЧА
«Розробка технології сухого екстракту суплідь хмелю в якості
активного фармацевтичного інгредієнта лікарських засобів»,

представлену до захисту на засіданні вченої ради Д 26.613.04 при Національній медичній академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація.

Актуальність теми:

Медична практика зазначає, що естрогени чинять багаточисельний вплив на жіночий організм. Біля 40-60% жінок в періменопаузі мають типові вазомоторні та психоемоційні симптоми, об'єднані в термін «клімактеричний синдром». «Золотим стандартом» лікування та профілактики порушень, пов'язаних з гормональним дисбалансом естрогенної природи, є гормональнозамісна терапія, але вона має значні побічні дії. Альтернативою є рослинні лікарські засоби з терапевтично активними компонентами естрогеноподібної дії – фітоестрогени (ФЕ). Фармакологічна активність ФЕ пов'язана зі схожістю їх хімічної структури зі структурою ендogenous естрогену -естрадіолу.

Відомо, що супліддя хмелю та продукти на його основі володіють потужною естрогенною активністю. Результати досліджень пренілованих флавоноїдів хмелю свідчать про перспективність одержання з сировини активного фармацевтичного інгредієнта - 8-пренілнарінгеніну (8-PN) в гармонійному поєднанні з хемопреентивною протираковою активністю ксантохумола (X).

В літературі описано декілька способів одержання екстрактів хмелю із підвищеним вмістом пренілових флавоноїдів. З аналізу наведених способів

отримання екстрактів хмелю видно, що за технічним вирішенням винаходи перевантаженні складними технологічними методами виконання окремих стадій або ж виходи пренілових флаванонів є не кількісно оптимальними і не з найкращим співвідношенням активних речовин.

В зв'язку з цим актуальність дослідження очевидна.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Української військово-медичної академії (номер державної реєстрації № 0114U003806) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України (Протокол № 80 від 17.04.2013 р.).

Мета і задачі дослідження

Метою кандидатської дисертації було наукове обґрунтування та розробка технології одержання стандартизованого сухого екстракту суплідь хмелю для профілактики та лікування розладів, обумовлених дефіцитом естрогенів або порушенням їх метаболізму.

Для досягнення мети дисертант вирішував такі завдання: провести бібліосемантичну оцінку літературних даних, визначити сорти хмелю; розробити методологію і дизайн дослідження, визначити оптимальні умови технологічних операцій; розробити загальну технологію одержання сухого екстракту, його специфікацію та критерії контролю якості продукту; розробити дослідно-промисловий регламент та апробувати технологію для імплементації в промислове виробництво; зробити узагальнення результатів фармакологічних досліджень; вивчити стабільність сухого екстракту в процесі виробництва і встановити умови зберігання та термін придатності сухого екстракту хмелю.

*Об'єктами дослідження слугували сухі екстракти та водно-спиртові витяги селекційних сортів суплідь хмелю із контрольованим кількісним вмістом ксантохумолу, ізоксантохумолу, 8-пренілнарінгеніну, 6-пренілнарінгеніну; супліддя хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*)*

селекційних сортів «Ксанта», «Чаклун», «Руслан»; екстрагенти (н-гептан, н-гексан, водно-етанольні розчини різних концентрацій).

Предметом дослідження був склад та технологія отримання сухого екстракту суплідь хмелю, як активного фармацевтичного інгредієнту лікарських засобів.

Використовувалися такі методи дослідження: бібліосемантичний - для узагальнення аналізу літературних і власних експериментальних даних; фармако-технологічні, біофармацевтичні, фізико-хімічні та фармакологічні методи досліджень; математично-статистичний та інші.

Застосовані методи доказово і достовірно відображають результати науково-практичного дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше науково обґрунтовано, опрацьовано склад та розроблено технологію отримання сухого екстракту хмелю з підвищеним вмістом активної фармацевтичної субстанції - пренілових флавоноїдів. Наведено алгоритм технологічного процесу з включенням проведення послідовних операцій.

Вперше для сухих суплідь хмелю застосовано та експериментально підтверджено ефективність попередньої обробки вихідної сировини водяною парою, досліджена кінетика процесу, як технологічного інструменту підвищення вмісту фармакологічно-активних компонентів в кінцевому продукті.

Вперше проведено комплексне системне дослідження з визначення оптимального сорту хмелю як вихідної сировини.

Вперше виявлені закономірності видалення ліпофільних речовин в залежності від кількості рослинної сировини, а також виду і кількості екстрагента для її знежирення.

Вперше для отримання високо якісного сухого екстракту хмелю було показана динаміка впливу термічних процесів в поєднанні з вакуумом на якісні показники предмету дослідження.

Досліджено вплив тривалості зберігання вихідної рослинної сировини в умовах прискореного і довгострокового зберігання.

Запропонована схема попередньої валідації технологічного процесу, яка буде основою поточної валідації промислового виробництва активного фармацевтичного інгредієнта - сухого екстракту хмелю.

Розроблено специфікацію та методи контролю якості сухого екстракту хмелю, вивчено його стабільність, визначено умови зберігання та термін придатності.

Доклінічними дослідженнями встановлено вплив сухого екстракту суплідь хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику в умовах дефіциту естрогенів.

Подано заявку на отримання патенту України на корисну модель (№ а 2014 03446).

Практичне значення одержаних результатів

Одержані результати науково-практичних досліджень є основою для оптимізації системних технологічних принципів розробки сухого екстракту суплідь хмелю для отримання активних фармацевтичних інгредієнтів. Підхід з використанням багаточисельних технологічних прийомів може бути використаний для практичного застосування в технології лікарських засобів рослинного походження із вмістом ліпофільних фракцій.

Кінцевим результатом виконання дисертаційної роботи є розробка технології одержання сухого екстракту суплідь хмелю із стандартизованим вмістом 8-пренілнарінгеніну, як основного компонента з відомою терапевтичною активністю.

Розроблено дослідно-промисловий регламент на виробництво препарату «Хмелю суплідь екстракт сухий». В умовах промислового виробництва на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» апробовано технологію одержання препарату.

В умовах лабораторії ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» розроблено та апробовано проект методів контролю якості «Хмелю суплідь екстракт сухий».

До навчального процесу ряду вищих учбових закладів впроваджено фрагменти роботи, зокрема: кафедри промислової фармації Національного фармацевтичного університету (акт від 2014 р.); кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт від 2014 р.); кафедри військової фармації Української військово-медичної академії (акт від 2015 р.); кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО імені П. Л. Шупика (акт від 2014 р.); кафедри технології ліків і біофармації ЛНМУ імені Данила Галицького (акт від 2015 р.).

Промислове виробництво сухого екстракту суплідь хмелю апробовано і впроваджено на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» (акт від 2015 р.).

Аналіз основного змісту роботи

Перший розділ «**Основні напрямки розробки лікарських засобів на основі лікарської рослинної сировини для лікування та профілактики порушень гормонального балансу естрогенної природи**» присвячено аналізу вітчизняної і світової літератури. Дисертант акцентує увагу на застосуванні гормональної терапії рослинного походження у жінок в період менопаузи.

Автор звертає увагу на здатність пренілфлавоноїдів хмелю до термічної ізомеризації, що необхідно враховувати в процесі розробки технологічного процесу активного фармацевтичного інгредієнта у вигляді комплексної субстанції.

Дисертант також приділяє увагу досягненням в технології одержання екстрактів суплідь хмелю. Він приходить до висновку, що за технічним вирішенням існуючі технології перевантаженні складними методами виконання окремих стадій, які не є оптимальними та не з найкращим співвідношенням активних речовин.

Аналізуючи методи екстрагування рослинної сировини, автор робить висновок, що жоден з методів має недоліки, а в якості альтернативного методу екстрагування пропонує метод фільтраційної екстракції.

Розглядаючи питання щодо належних практик у виробництві фармацевтичних продуктів рослинного походження, він підкреслює, що імплементація вимог керівництв GACP та GMP дозволить гарантувати якість, безпеку та ефективність рослинного ЛЗ.

Таким чином, дисертант проаналізував літературні джерела по всім питанням, які поставлені в дослідженні.

У другому розділі **«Обґрунтування загальної концепції та методів досліджень»** дана характеристика об'єктів дослідження, наводяться методи досліджень: фізико-хімічні, технологічні, біофармацевтичні, фармакологічні, методи фармако-технологічних випробовувань та ін.

У методологічному ґрунтуванні наведена концептуальна технологічна схема одержання екстракту з врахуванням існуючих підходів та раціональності її імплементації в промислове виробництво.

Дисертант переконливо обґрунтував план експерименту і запропонував прийнятний дизайн дослідження.

У третьому розділі **«Експериментальне обґрунтування та розробка технології сухого екстракту хмелю»** наведено дослідження та визначено оптимальні умови екстрагування ліпофільної фракції суплідь хмелю з метою її видалення з сировини. Враховуючи фізико-хімічні властивості основних груп активних речовин суплідь хмелю, одержання екстракту з високим вмістом пренілових флавоноїдів потребувало попереднього видалення неполярної фракції. Дисертант обґрунтував оптимальні умови екстрагування суплідь хмелю з максимальним вільненням речовин ліпофільної природи.

У результаті екстракції сировини хмелю з використанням в якості екстрагенту н-гептану було визначено кількісні та якісні показники процесу. Щодо селективності застосованого екстрагенту, то н-гептан виявив

селективність саме до ліпофільної фракції речовин хмелю. Одержані результати свідчать про доцільність його застосування, як екстрагенту.

У подальшому дисертант досліджував вплив попередньої термічної обробки суплідь хмелю на кількісний вміст пренілових флавоноїдів у сухому екстракті. Одним з таких шляхів підвищення вмісту була визначена термічна ізомеризація. Результати показали, що попередня обробка суплідь хмелю водяною парою призводила до значного збільшення вмісту активних речовин.

Таким чином, технологічним інструментом з підвищення кількісного вмісту пренілових флаванонів в кінцевому екстракті стала термічна обробка вихідної сировини водяною парою.

В якості методу екстрагування автор використовував метод двоступеневої фільтраційної екстракції при кімнатній температурі з попередньою термічною обробкою вихідної сировини.

Наступним етапом роботи дисертанта стало визначення оптимального сорту хмелю. В якості вихідної сировини використані супліддя хмелю 3-х сортів («Руслан», «Ксанта», «Чаклун») і 3 види екстрагента (н-гексан, етанол 96%, вода очищена). Одержані результати свідчать про те, що екстракт, отриманий з суплідь хмелю сорту «Ксанта», характеризується збалансованим компонентним складом пренілових флавоноїдів та містить найбільшу кількість 8-PN і є оптимальним сортом вихідної сировини.

Подальшим дослідженням було визначено вплив термічних процесів упарювання та сушки рідкого витягу хмелю на кількісний вміст X, IX, 8-PN та 6-PN у сухому екстракті з метою створення алгоритму виконання технологічних операцій.

Автор прийшов до висновку, що підвищення температури та/або зменшення глибини вакууму, тобто параметрів здатних підвищити температуру кипіння в процесі упарювання та сушки витягу, може призвести до більшого зниження кількісного вмісту активних речовин у сухому екстракті суплідь хмелю.

Дослідження впливу концентрації етанолу на екстрагування пренілових флавоноїдів показало, що вибір 70% етанолу в якості екстрагенту на другому ступені екстрагування є практично обґрунтованим. Ефективність обраної концентрації етанолу демонструють показники кількісного вмісту X, IX, 8-PN, 6-PN в екстракті в поєднанні із найвищим виходом 8-PN, як компонента з найбільшою естрогенною активністю та найбільшим виходом.

Дослідження впливу тривалості зберігання суплідь хмелю на стабільність пренілових флавоноїдів у сухому екстракті довело, що їх кількісний вміст залежить від тривалості зберігання вихідної сировини. Автор показує, що доцільним може бути «сезонне» виробництво екстракту із свіжозібраного врожаю хмелю або використання у виробництві сировини із терміном зберігання не більше 1 року.

Дисертантом детально та в повному об'ємі досліджено кожен з технологічних стадій процесу. Визначено оптимальні умови видалення ліпофільної фракції з використанням алканів, умови екстрагування пренілових флавоноїдів етанольними екстрагентами; визначено сорт хмелю з максимальною кількістю АФІ; вивчено характер впливу температури в технологічному процесі та тривалості зберігання сировини на якість продукту. Вперше автором застосовано обробку вихідної сировини водяною парою в якості технологічного інструменту термічної ізомеризації пренілових флавоноїдів.

Таким чином, дисертантом розроблено спосіб отримання екстракту хмелю та експериментальними дослідженнями доказово доведено вплив технологічних факторів на критерії якості сухого екстракту суплідь хмелю.

У четвертому розділі **«Розробка дослідно-промислового регламенту та валідація процесу»**. Ключовим етапом розробки технології є її трансфер в умови промислового виробництва. Дисертантом були покладені в основу достовірні і обґрунтовані експериментальні результати для розробки дослідно-промислового регламенту. Даний вид нормативної документації є базою для імплементації технологічного процесу у масове промислове

виробництво з валідацією процесу. Технологічна схема передбачає алгоритм виконання процесу та контроль параметрів на всіх стадіях. Процес виготовлення складається із 7 стадій: підготовка сировини, термічна ізомеризація, видалення ліпофільних речовин, одержання водно-спиртового витягу, упарювання водно-спиртового витягу, одержання сухого екстракту, фасування, пакування та маркування сухого екстракту.

Автор звертає увагу на супровідну документацію, що може бути покладена в основу стандартних операційних процедур.

Згідно встановленої автором технологічної документації було напрацьовано дослідно-промислову серію сухого екстракту суплідь хмелю в умовах виробництва ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Запропонована технологія продемонструвала свою відтворюваність. Кількісні характеристики одержаного екстракту та дані з валідації підтвердили правильність та ефективність розробленої технології.

П'ятий розділ **«Вивчення стабільності сухого екстракту хмелю та розробка методів контролю якості»** присвячено встановленню специфікації сухого екстракту суплідь хмелю, яку розроблено на підставі одержаних в процесі розробки експериментальних даних, а також загальноприйнятих для рослинних препаратів показників якості. Критерії їх прийнятності базувались на даних розробки та описаних в ДФУ та ЄФ.

Специфікація для сухого екстракту суплідь хмелю складалась із параметрів, які контролювали якість всіх стадій технологічного процесу: якість суплідь хмелю як вихідної сировини; вміст активної речовини(н) в екстракті, розчинників (н-гексан, етанол); метод отримання екстракту з рослинної сировини; складові - компоненти з відомою терапевтичною дією (8-PN) та активні маркери (X та IX); інші складові (компоненти гіркої смоли); умови висушування екстракту; профіль і стабільність компонентів; мікробіологічну чистоту при зберіганні; серії, які використовувались при доклінічних дослідженнях випробуваннях.

На основі проекту методів контролю якості автор досліджував стабільність сухого екстракту суплідь хмелю. Вивчення проводилося на дослідно - промисловій серії в умовах довгострокового та прискореного зберігання згідно положень нормативних документів. Було встановлено, що досліджуваний рослинний препарат є стабільним та відповідає вимогам проектної специфікації з якості. Термін придатності сухого екстракту хмелю становив термін 2 роки.

У шостому розділі **«Результати фармакологічних властивостей сухого екстракту хмелю»** наведені результати доклінічних досліджень впливу активних компонентів екстракту хмелю на основні чинники кардіо-метаболічного ризику за умов дефіциту естрогенів.

Дисертантом із співавторами показано, що у тварин з метаболічним синдромом (МС) на фоні гіпоестрогенії спостерігається підвищення концентрації загальних ліпідів в сироватці крові. Загальна антиоксидантна активність сироватки крові залишалася підвищеною в порівнянні з аналогічним показником у інтактних тварин.

Застосування екстракту хмелю сприяло зменшенню концентрації фібриногену, що свідчило про безпеку його використання у постменопаузальних жінок з підвищеним ризиком тромбоутворення.

При вивченні впливу активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан центральної нервової системи щурів з МС встановлено, що введення екстракту хмелю оварієктомованим щурам з МС послаблювало стан депресії.

При дослідженні впливу активних компонентів екстракту хмелю на функціональний стан серцево-судинної системи щурів з МС на фоні дефіциту естрогенів показано, що введення активних компонентів екстракту хмелю відновлювало регулярність серцевих скорочень.

Таким чином, дисертант Добровольний О.О. професійно грамотно із використанням світового досвіду і власного експерименту вирішив

поставлені завдання і реалізував мету: розробив технологію сухого екстракту суплідь хмелю в якості активного фармацевтичного інгредієнта лікарських засобів.

Повнота викладу основних результатів роботи в опублікованих працях.

Результати дисертаційних досліджень представлено у 10 наукових роботах, серед яких 5 статей у фахових виданнях. Публікації виходили в період з 2010 по 2015 рік та містять матеріали всіх експериментальних розділів дисертації. Окремі результати роботи були представлені на науково-практичних вітчизняних і міжнародних конференціях, а також на УІІ Національному з'їзді фармацевтів України та опубліковані у вигляді 4 тез доповідей. На основі проведених досліджень автором подано заявку на отримання патенту України на корисну модель (№ а 2014 03446).

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження.

В результаті проведення дисертаційних досліджень розроблені автором науково обґрунтовані підходи до розробки технологічного процесу приготування екстракту суплідь хмелю дозволяють використовувати їх в практичній діяльності підприємств, що спеціалізуються на виробництві лікарських засобів рослинного походження.

Запропоновані автором методологічні підходи та алгоритми проведення технологічного процесу приготування екстракту суплідь хмелю є теоретичним та практичним підґрунтям для подальших наукових досліджень у цьому напрямку.

Структура та зміст автореферату повністю відповідають дисертації.

До дисертанта є певні запитання:

1. У зв'язку з чим запропоновано проведення термічної ізомеризації пренілових халконів шляхом обробки суплідь хмелю водяною парою? Відомо більш технічно простий метод, зокрема, проведення термічної ізомеризації шляхом мацерації у воді при нагріванні.

2. У зв'язку з чим технологія виробництва сухого екстракту суплідь хмелю не передбачає технологічних прийомів зі зниження мікробіологічної контамінації і яким чином здійснюється її забезпечення? Відомо, що лікарська рослинна сировина характеризується високим рівнем мікробіологічної контамінації.

3. В дисертації зустрічаються невдалі стилістичні речення і друкарські помилки.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Добровольного Олександра Олександровича «Розробка технології сухого екстракту суплідь хмелю в якості активного фармацевтичного інгредієнта лікарських засобів», яка представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за сукупністю всіх ознак: актуальність теми, новизна, теоретична і практична значимість, ступінь обґрунтованості наукових положень, об'єм досліджень, їх достовірність і глибина, висновки і рекомендації, повнота викладення у опублікованих працях відповідає вимогам п. 9, 11 положення «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника»- постанова № 567 Кабінету міністрів України від 24 липня 2013 року, і рекомендується до присвоєння вченого звання кандидата фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація.

Офіційний опонент:

професор кафедри фармацевтичної технології

і біофармації НМАПО імені П. Л. Шупика

д.фарм.н., професор

Р.С.Коритнюк

Підпис професора Коритнюк Р.С. засвідчую