

ВІДГУК

офіційного опонента завідувача кафедри фармації
Івано-Франківського національного медичного університету, доктора
фармацевтичних наук Грицика Андрія Романовича на дисертаційну
роботу *Кречун Анастасії Вадимівни* «Дослідження біологічно
активних речовин півників угорських та розробка субстанцій на їх
основі», подану до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.005 при
Національному фармацевтичному університеті, що утворена наказом
МОН № 1287 від 21.10.2020 р. для розгляду та проведення разового
захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з
галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація»

Актуальність теми дисертації

Вірусні захворювання є однією з найбільш актуальних проблем сучасної медицини. Значна поширеність вірусних інфекцій та велика питома вага в структурі захворюваності постійно привертають увагу фахівців.

Все це спонукає фахівців до пошуку можливості застосування для лікування і профілактики вірусних інфекцій препаратів рослинного походження, які мають ряд переваг: низьку токсичність, малу кількість побічних ефектів, можливість застосування у лімітованих груп населення, можливість тривалого застосування, низьку вартість. На фармацевтичному ринку відсутні препарати противірусної дії на основі сировини півників або/та мангіферину, тож дослідження рослин родини Півникові та розробка субстанцій на їх основі є актуальним питанням у наш час.

Дослідження ксантонів ведуться з 1969 р. в Франції, Японії, США, Швеції, Індії тощо. На сьогодні із 150 рослин родин Тирличеві, Звіробійні й Тутові виділено і вивчено близько 300 ксантонових сполук, біологічна активність яких залежить від їх структури. Мангіферин стимулює ЦНС, у високих дозах спричиняє кардіотонічну й діуретичну дію; виявляє

антибактеріальну і протизапальну дію. На основі мангіферину з трави солодушки альпійської (*Hedysarum alpinum* L.) одержують препарат Алпізарин, який використовують для лікування герпесу та інших вірусних захворювань. Дослідження ЛРС, яка є джерелом ксантонів і проявляє протівірусну активність, є актуальним.

Сировина півників містить сполуки фенольної природи – ксантони, флавоноїди, ізофлавоноїди, сапоніни, таніни, прості феноли, що мають широкий спектр біологічної активності. Сировинні запаси півників досить великі, що робить можливим дослідження та виділення біологічно активних речовин з цієї сировини. Кореневище півників використовують у народній медицині у якості протизапального, ранозагоювального, сечогінного, відхаркувального, протигрибкового засобу.

Перспективною сировиною для дослідження та виділення БАР є півники угорські (*Iris hungarica*), що широко розповсюджені на території України та країнах ближнього зарубіжжя. Об'єктами досліджень були також 5 сортів гібридних півників, культивування яких робить заготівлю і розмноження і контрольованим на усіх етапах вирощування. Хімічний склад культивованих півників схожий з дикорослим видом півників угорських. Фармакогностичне дослідження сортових півників дозволить розширити сировинну базу для заготівлі.

Півники угорські є практично не дослідженою сировиною, які разом з гібридними півниками вивчались, переважно, у селективному та агрономічному напрямку.

Все вищенаведене свідчить про актуальність дослідження сировини півників угорських та сортових півників.

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

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної

науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Новизна дослідження та одержаних результатів

Наукова новизна результатів дисертаційного дослідження полягає в комплексному фітохімічному вивченні різних класів БАР листя та кореневищ півників угорських і сортових півників, виділенні індивідуальних сполук, одержанні сухих екстрактів і встановленні їх фармакологічної активності.

Вперше за допомогою ТШХ, ПХ, ВЕТШХ та ВЕРХ у досліджуваній сировині півників угорських та сортових півників було ідентифіковано сполуки ксантонової природи, похідні гідроксикоричної кислоти, флавоноїди, ізофлавоноїди, амінокислоти.

Методом ГХ у кореневищі півників угорських встановлено вміст вільних амінокислот, методом спектрофотометрії у листі та кореневищі півників угорських та сортових півників встановлено вміст основних груп БАР – флавоноїдів, ізофлавоноїдів, гідроксикоричних кислот, ксантонів.

Вперше проведено дослідження вмісту основних груп БАР в листі та кореневищі півників угорських з різних місць зростання на території України. Методом ВЕРХ у кореневищі півників угорських ідентифіковано 7 сполук: мангіферин, текторидін, нігрицин-4'-O- β -D-глюкопіранозид, ірисктекоригенін В, нігріцин, іригенін, 5,6-дигідрокси-7,8,3',5'-тетраметоксиізофлавонол; у листі півників угорських – хлорогенова кислота і мангіферин, встановлено їх вміст. За допомогою методу колонкової хроматографії з кореневищ півників угорських було виділено 18 речовин, у листях та кореневищах півників угорських методом ВЕТШХ встановлено вміст ксантонового глікозиду мангіферину.

У сировині півників угорських та сортових півників хромато-мас-спектрометричним методом досліджено компонентний склад ефірної олії, а також встановлено вміст макро- та мікроелементів.

Розроблено технологію одержання біологічно активних речовин у вигляді сухого екстракту з листя та кореневищ півників угорських, запропоновано параметри їх стандартизації

Встановлено основні морфолого-анатомічні діагностичні ознаки сировини півників угорських, розроблено проекти методик контролю якості сировини півників угорських.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель 135620, № u 2019 00863 від 28.01.19.

Практичне значення отриманих результатів

Розроблено проекти МКЯ «Півників угорських листя», «Півників угорських кореневища», «Півників угорських листя екстракт сухий», «Півників угорських кореневища екстракт сухий», «Півників угорських листя екстракт водний сухий», що може бути використано для впровадження у промислове виробництво.

Вперше розроблено метод виділення мангіферину з листя півників угорських (заявки на винахід а 2019 10508 та корисну модель u 2019 10516). Результати досліджень щодо оптимальних умов культивування та заготівлі півників викладено в 2 інформаційних листах. Матеріали роботи впроваджені у навчальний процес ЗВО.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційну роботу виконано на сучасному науковому рівні. Використані автором методи досліджень відповідають поставленим завданням і сучасним вимогам, вони є об'єктивними та складають основу наукової інтерпретації результатів, що визначає вагому теоретичну

значимість роботи. Висновки, наведені у дисертаційній роботі, цілком аргументовані і логічно витікають зі змісту роботи.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків

Дисертаційна робота викладена на 250 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 4 додатків, з яких 1 додаток містить 4 акти впровадження. Обсяг основного тексту дисертації складає 162 сторінки друкованого тексту. Робота проілюстрована 41 таблицями, 52 рисунками, 4 схемами. Список використаних джерел налічує 176 найменування, з них 86 кирилицею та 90 латиницею.

У **вступі** (обсяг – 9 стор.) дисертантом наведена актуальність обраної теми, сформульовані мета та задачі досліджень, визначена наукова новизна одержаних результатів та практичне значення отриманих результатів.

У **першому розділі** (обсяг – 19 стор., табл. - 7, рис. - 10) наведено дані щодо сучасного стану дослідження рослин роду *Iris*, короткий опис ботанічної характеристики, систематики, природного розповсюдження та розмноження рослин родини Півникові. Наведено хімічний склад, застосування у народній та офіційній медицині листя та кореневищ півників угорських. В розділі 1.5 проаналізовано сучасний стан використання рослин родини *Iridaceae*, наведено результати порівняння вимог якості сировини півників за показниками різних нормативних документів, різних країн та різних років. Автор робить висновок, що представники родини *Iridaceae* є перспективною сировиною для розробки нових фітопрепаратів. Застосування півників у народній медицині зумовлена вмістом різних груп БАР, що є передумовою для поглибленого фармакогностичного вивчення. Півники угорські флори України є мало вивченою рослиною, а сорти гібридних півників – зовсім не досліджені, що створює передумови для дослідження даної сировини півників.

Другий розділ «Якісний та кількісний аналіз сировини півників» (обсяг – 52 стор., табл. - 16, рис. - 12) присвячений якісному та кількісному аналізу біологічно активних речовин сировини півників угорських та сортових півників. В розділі 2.1 представлено загальну методологію дослідження, наведено методи хроматографічного, фізичного, фізико-хімічного та хімічного, фармакологічного, морфолого-анатомічного та статистичного аналізу. В розділі 2.2 представлено результати якісного аналізу листя та кореневищ півників угорських та сортових півників. Виявлено наявність в сировині флавоноїдів, сапонінів, кумаринів, танінів, простих фенолів. Хроматографічними методами в порівнянні зі стандартними зразками встановлена наявність органічних та гідроксикоричних кислот, агліконів ізофлавоноїдів, флавоноїдів та вільних амінокислот. За допомогою методів газової хроматографії-мас-спектрометрії, спектрофотометрії автором встановлено вміст вільних амінокислот, флавоноїдів, ізофлавоноїдів, гідроксикоричних кислот, ксантонів. Методом ВЕРХ в кореневищі та листі півників ідентифіковано 7 та 2 сполуки відповідно, серед яких ізофлавонони, ксантонмангіферин. Методом ВЕТШХ в листях та кореневищах півників угорських встановлено вміст ксантонового глікозиду мангіферину, методом хромато-мас-спектрометрії – вміст компонентів ефірної олії листя та кореневищ півників угорських та сортових півників. Наведено результати аналізу жирнокислотного складу кореневищ півників угорських. Методом атомно-емісійної спектроскопії з дуговим збудженням встановлено якісний і кількісний вміст 19 макро- і мікроелементів листя та кореневищ півників угорських та сортових півників та закономірності нагромадження в залежності від виду сировини.

Дисертант встановила закономірності нагромадження основних груп біологічно активних речовин півників угорських з різних місць зростання, представлено висновки щодо перспективності використання сировини півників угорських, враховуючи вміст окремих груп – ефірної олії, жирних кислот тощо.

У третьому розділі «Виділення природних сполук з кореневищ півників угорських» (обсяг – 24 стор., табл. - 2, рис. – 21, схеми - 2) наводяться результати виділення з кореневищ півників угорських методом колонкової хроматографії індивідуальних сполук – було виділено та встановлено структуру 18 речовин, серед яких флавоноїди, ізофлавоноїди, ксантони, оксикоричні кислоти. Хімічну будову виділених сполук підтверджено даними УФ-, ІЧ-, ^1H -ЯМР-спектроскопії, мас-спектрометрії, фізико-хімічних властивостей. Розроблено спосіб одержання мангіферину з листя півників угорських, встановлено фізико-хімічні характеристики сполуки.

Четвертий розділ «Розробка МКЯ, технологічних параметрів одержання субстанцій та встановлення їх фармакологічної активності» (обсяг – 45 стор., табл. - 16, рис. –9, схеми - 2) присвячений розробці методик контролю якості сировини півників угорських. Представлено запропоновані показники якості з розділів «Ідентифікація» (макро- та мікроскопічний аналіз, ТШХ), «Випробування» (втрата в масі при висушуванні, загальна зола) та «Кількісне визначення». Представлено результати мікроскопічного дослідження листя, кореневища та кореня півників угорських (рис. 4.1, 4.2, 4.3), в розділі МКЯ «Ідентифікація» наведено мікроскопічне дослідження порошку листя та кореневища. В дисертаційні роботі представлено технологію одержання комплексів біологічно активних сполук з листя та кореневищ півників угорських. Встановлено, що екстракти належать до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова., досліджено їх фармакологічну активність (протизапальна, анаболічна (*in vivo*), антимікробна, антигерпетична, антиоксидантна). Дисертант Кречун А.В. стверджує, що перспективними субстанціями є екстракти сухі листя і кореневища (екстрагенти – 70 % етанол), екстракт сухий водний листя.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях

Серед наукових праць, опублікованих у співавторстві, у дисертації наведені лише ті положення, розробки та рекомендації, які є результатом особистих досліджень автора. За матеріалами дисертації опубліковано 28 наукових робіт, у тому числі 7 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 – у виданнях, що індексуються у наукометричних базах Scopus, 18 тез доповідей, 1 патент України на корисну модель, 2 інформаційний лист.

Апробація результатів дисертації

Фаховий семінар з попередньої експертизи результатів дисертаційної роботи Кречун А.В. відбувся 25.08.2020 р. на кафедрі фармакогнозії під головуванням завідувача кафедри, доктора фармацевтичних наук, професора Кошового О. М. за участю рецензентів доктора фармацевтичних наук, професора Ільїної Т. В. та доктора фармацевтичних наук, професора Гонтової Т.М. Також на фаховому семінарі з попередньої експертизи дисертації були присутні співробітники кафедр фармакогнозії, хімії природних сполук і нутриціології, ботаніки Національного фармацевтичного університету. На всі поставлені питання дисертантом було надано ґрунтовні та логічні відповіді.

Зауваження і пропозиції.

Результати роботи вірогідні, висновки зроблені на їх основі не викликають заперечень. Проте виникають питання та є ряд зауважень:

1. В розділі 3 «Виділення природних сполук з *кореневищ* півників угорських» наведено новий спосіб одержання мангіферину з *листя* півників угорських (розділ 3.4 «Розробка способу виділення мангіферину з *листя* півників угорських»).

2. В розділі 4.1 «Розробка методик контролю якості *сировини* півників угорських» представлено параметри стандартизації *екстрактів* з листя та кореневищ півників.

3. За класифікацією К.К. Сидорова при внутрішньошлунковому введення доза 500-2500 мг/кг відповідає IV класу токсичності – малотоксичні сполуки (Стефанов О.В., 2001). При дослідженні гострої токсичності тварини були розділені на групи по 4 тварини, що не дозволяє статистично достовірно підтвердити належність досліджуваних екстрактів до класу токсичності (розділ 4.5.1, табл. 4.5, стор. 155 - 156).

У порядку проведення наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на наступні питання:

1. Макро- та мікроелементи як біотики відіграють важливу роль в підтримці гомеостазу в організмі людини, обумовлюють вплив на процеси тканинного дихання, поділ клітин, ріст, розмноження. В розділі 2 представлено кількісний вміст макро- та мікроелементів в сировині досліджуваного виду, обґрунтовано можлива фармакологічна дія лікарської рослинної сировини. Кількісне визначення макро- і мікроелементів доцільно проводити в порівнянні з їх вмістом в ґрунті, що дозволяє встановити закономірності їх нагромадження в сировині та виключить можливість попадання важких та токсичних елементів, а також важливим є встановлення закономірностей їх вмісту в сировині і в розроблених фітозасобах.

2. Об'єктами досліджень були півники угорські (*Iris hungarica*) та 5 сортів гібридних півників, які широко розповсюджені на території України та країнах ближнього зарубіжжя. Види сортових півників відрізняються різноманітністю забарвлення, висотою, за терміном початку цвітіння. Якими є Ваші рекомендації щодо можливого використання окремих сортів гібридних півників, як рівноцінної сировини до півників угорських?

3. Традиційно вважають, що фітопрепарати мають низький рівень ризиків щодо безпеки. Споживачі цих препаратів впевнені, що вони мають суттєві переваги над лікарськими засобами синтетичного походження, хоча є

ризика пов'язані з вихідною сировиною, яка внаслідок особливостей отримання може бути контамінована мікроорганізмами, пестицидами, важкими металами. Які рекомендації щодо вирощування згідно вимог *Good Agricultural and Collection Practice* Ви може запропонувати для забезпечення належної якості рослинної сировини?

4. Які рекомендації щодо сушіння лікарської рослинної сировини Ви можете запропонувати? Доцільним узагальнення цієї інформації і представлення у вигляді проєктів «Інструкції із заготівлі і сушіння ЛРС».

Дослідження в дисертаційній роботі Кречун А.В. виконані на сучасному науковому рівні, що свідчить про високий рівень знань, теоретичної та практичної підготовки дисертанта. Розділи дисертації включають теоретичний і практичний аспект дослідження, кожен розділ та підрозділ присвячується певній задачі, поставленій дослідженням. Новизна, достовірність наукових теоретичних і практичних результатів не викликає сумнівів. Наведені дискусійні моменти та зауваження не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Відповідність дисертації вимогам, що пред'являються до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. Розглянувши дисертацію Кречун Анастасії Вадимівни за темою «Вивчення біологічно активних речовин півників угорських та розробка субстанцій на їх основі» (наукові керівники – доктор фармацевтичних наук, професор Ковальов В.М., кандидат фармацевтичних наук, асистент Михайленко О.О.) та наукові праці, у яких висвітлені основні наукові результати, визначивши особистий внесок дисертанта та співавторів, а також за результатами попередньої експертизи (фахового семінару), вважаю, що робота є актуальною та виконана з використанням сучасних методів експериментального дослідження, має наукову та практичну значимість отриманих результатів проведених досліджень.

Дисертація Кречун Анастасії Вадимівни за темою «Вивчення біологічно активних речовин півників угорських та розробка субстанцій на їх

основі» є закінченим науковим дослідженням, у якому одержано та представлено нові науково обґрунтовані результати.

Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам, передбаченим п. 10 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06 березня 2019 року (зі змінами, затвердженими постановою КМУ від 21 жовтня 2020 р. № 979) відносно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація».

Завідувач кафедри фармації Івано-
Франківського національного
медичного університету

д-р фарм. наук, професор Грицик А. Р.

