

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Мельник Марії Володимирівни на тему:

«Фармакогностичне дослідження рослин роду Рута»

представлену до спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 при Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми. Серед рослин, які застосовують як протизапальні, антисептичні, діуретичні та спазмолітичні засоби, особливу увагу заслуговують види роду Рута (*Ruta L.*) родини Рутові (*Rutaceae*). В українській флорі налічують два види роду Рута – це рута садова (*Ruta graveolens L.*) та рута розлога (*Ruta divaricata Ten.*). Рута садова відома як декоративна, лікарська та ефіроносна рослина.

Тому актуальним для фармації є дослідження основних груп біологічно активних речовин трави виду *Ruta graveolens*, одержання і встановлення фармакологічних властивостей лікарських субстанцій на їх основі, стандартизація і контроль якості сировини і препаратів, вивчення їх безпечності на рівні доклінічних досліджень, вивчення методів розмноження та умов вирощування рути садової.

На сьогодні фармацевтичне виробництво орієнтовано на виконання рекомендацій належної виробничої практики (GMP) і тому вимоги GACP (Належної практики культивування та збирання лікарських рослин) щодо практики вирощування рослин для стабільної якості лікарської рослинної сировини є назрілими та необхідними. Дійсно, лікарське рослинництво в Україні знаходиться в початковому стані та потребує розвитку на основі наукових підходів.

Набирають значущості рекомендації GACP щодо екологічно обґрунтованої технології вирощування, правил заготівлі культивованої та дикорослої лікарської сировини, переробки, збереження.

Для рослинної сировини насамперед необхідні такі показники якості як, по-перше, стабільність складу і кількісного вмісту біологічно активних речовин, по-друге, відтворюваність фармакологічної дії лікарської рослинної сировини та препаратів на її основі. Розробка цих питань, які сприяють підвищенню якості ЛРС і просуванню сировини та вітчизняних

фітопрепаратів на міжнародний ринок, є актуальною для фармацевтичної науки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відповідності з планом науково-дослідних робіт Проблемної комісії «Фармація» МОЗ і АМН України (протокол № 71 від 19.10.2011 р.), вона є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету «Дослідження деяких дикорослих і культивованих лікарських рослин західного регіону України та розробка лікарських засобів на їх основі» (номер державної реєстрації 0110U006205).

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведеного комплексного фітохімічного дослідження трави рути садової вперше встановлено якісний склад та кількісний вміст ефірної олії, фенольних сполук (кумаринів, флавоноїдів, танінів), органічних кислот (гідроксикоричних, жирних, амінокислот), вуглеводів, макро- та мікроелементів. Методом високоефективної рідинної хроматографії у траві рути садової ідентифіковано 18 речовин, з них 6 флавоноїдів – апігенін, рутин, кверцетин, лютеолін, ізокверцитрин, гіперозид; 4 гідроксикоричних кислоти – *n*-кумарову, кавову, розмаринову, хлорогенову; 2 кумарини – кумарин, скополетин; 6 танінів – галову та елагову кислоти, галокатехін, епігалокатехін, епікатехін, епікатехіну галат.

За допомогою колонкової хроматографії в індивідуальному стані виділено 9 сполук: 3 гідроксикоричні кислоти – *n*-кумарова, кавова, хлорогенова; 1 кумарин – кумарин; 5 флавоноїдів – апігенін, лютеолін, кверцетин, гіперозид, рутин.

З трави рути садової виділено фракції полісахаридів, вміст водорозчинних полісахаридів у траві рути садової становить 2,30 %, пектинових речовин – 1,10 %, геміцелюлози А – 5,17 %, геміцелюлози Б – 2,55 %; ідентифіковано глюкозу, фруктозу, рамнозу та ксилозу.

Вперше у траві рути садової ідентифіковано та встановлено вміст 17 амінокислот, серед яких переважають гліцин, аргінін, валін, аланін та серин. Вперше методом хромато-мас-спектрометрії ідентифіковано та встановлено вміст 16 жирних кислот, серед них переважають ліноленова, лінолева, олеїнова та пальмітинова.

Вперше хромато-мас-спектрометричним методом в ефірній олії трави рути садової виявлено та встановлено вміст 34 сполук, серед яких

ідентифіковано 20: вуглеводні, спирти, альдегіди, кетони, ароматичні сполуки. Основними компонентами ефірної олії трави рути садової є ундеканон-2 (метилнонілкетон), який становить 33,58 %, нонанол-2 ацетат (метилгептилкарбінол-ацетат) – 23,15 %, ундеканол-2 (метилнонілкарбінол) та ундеканол-2 ацетат, які у сумі складають 13,44 %, та нонанон-2 (метилгептилкетон) 10,73 %.

Вперше встановлено особливості для компонентного складу ефірної олії рути садової прикарпатського регіону, а саме, співвідношення кетонів ундеканон-2 та нонанон-2 (3 : 1).

Вперше встановлено, що вміст суми поліфенолів, флавоноїдів, кумаринів, танінів у траві рути садової залежить від року вегетації рослини та варіанту внесення добрив. Встановлено, що у траві рути садової максимальна кількість БАР накопичується у фазі масового цвітіння на 4 рік життя рослини: вміст суми поліфенолів становить 3,20 %; вміст кумаринів – 1,02 %; окиснюваних поліфенолів – 2,70 %; флавоноїдів – 2,15 %.

Вперше опрацьовано оптимальні параметри одержання екстрактів РС-4 та РС-7, розроблено методики стандартизації. Вперше встановлено безпечність екстрактів та визначено, що екстракти РС-4, РС-9 та РС-9,6 мають помірну, а екстракт РС-7 виражену антимікробну, антифунгальну та протизапальну дію.

Вперше встановлено макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки рути садової та рути розлогої.

Вперше розроблено м'яку лікарську форму - мазь (патент України на корисну модель «Спосіб одержання мазі з екстрактом рути садової та встановлено її протизапальні властивості» (№ 108973 від 10.08.2016 р.).

Вперше розроблено розсадний спосіб вирощування рути садової в касетах із полімерних матеріалів для оптимізації вирощування рослини, що захищено патентом України на винахід «Спосіб вирощування розсади рути садової» (№ 110566 від 12.01.2016 р.).

Вперше вивчено фенологічні умови та розроблено агротехнічні методики вирощування рути садової в умовах Прикарпаття за вимогами GACP.

Практичне значення одержаних результатів. Доведено доцільність застосування трави рути садової у практичній медицині і створення на її основі фітопрепаратів. За результатами фітохімічних та агротехнічних досліджень розроблено проекти МКЯ «Рути садової трава», «Рути садової

трави екстракт густий», проект «Інструкції із заготівлі та сушіння трави рути садової».

За матеріалами роботи видано монографію «Природа лікує... Перспективи використання рослин роду Рута у медицині та фармації», основні положення роботи впроваджено в навчальний процес кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету, клінічної фармакології та фармакотерапії Луганського державного медичного університету, фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського, фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету, фармації Буковинського державного медичного університету, фармакогнозії Національного фармацевтичного університету, загальної та клінічної фармації Дніпропетровської державної медичної академії, фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акти впровадження від 16.01.2014, 29.01.2014, 10.02.2014, 12.02.2014, 14.02.2014, 17.02.2014, 03.03.2014, 07.04.2014 року відповідно).

Результати експериментальних досліджень з агротехніки вирощування рути садової впроваджено в практичну роботу відділу з інтродукції та акліматизації лікарських рослин Ботанічного саду Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника (акт впровадження від 17.12.2013 р.). Експериментальні дослідження з розмноження та вивчення фенологічних етапів органогенезу рути садової впроваджені на навчально-дослідних ділянках лікарських рослин фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету (акт впровадження від 29.12.2015 р.).

Аналіз дисертаційної роботи. Робота складається зі вступу, огляду наукових першоджерел, експериментальної частини, яка містить 4 розділи, в яких представлені об'єкти і методи дослідження, результати експериментальної роботи; загальні висновки, список використаних першоджерел та додатки.

Дисертаційну роботу викладено на 233 сторінках друкованого тексту, з них на 30 сторінках представлені додатки. Дисертацію ілюстровано 26 рисунками та 68 таблицями. Список використаних джерел містить 190 найменувань, з яких 166 кирилицею та 24 латиною.

У **вступі** обґрунтовано актуальність фармакогностичного дослідження рослин роду Рута, формулюються мета та завдання досліджень, визначено об'єкт та предмет досліджень, відзначаються наукова новизна та практична значимість отриманих результатів, відомості про впровадження і апробацію результатів роботи та відображено зв'язок з науковими програмами і планами та представлено структуру та обсяг дисертації.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 25 наукових праць, у тому числі 11 статей, з них 5 – у фахових наукових виданнях України та 1 у іноземному виданні; 1 патент України на винахід; 1 патент України на корисну модель; 11 тез доповідей; 1 монографія.

У **першому розділі “Види роду Рута – перспективні лікарські рослини”** дисертантом узагальнено результати проведеного інформаційно-патентного пошуку щодо теми роботи. Представлено аналіз наукових першоджерел щодо ботанічної характеристики, розповсюдження, умов зростання і природного розмноження, хімічного складу та використання в науковій та народній медицині рослин роду Рута. Резюмуючи, автор формулює невирішені проблеми, що створюють передумови для подальшого дослідження.

Другий розділ “Об'єкти, методи та матеріали дослідження” присвячено основним положенням загальної методології, використаним методикам, приладам та реактивам, що використовувались при проведенні фітохімічних, технологічних, біофармацевтичних, фармакологічних та ресурсознавчих досліджень.

У **третьому розділі “Вивчення хімічного складу та кількісного визначення біологічно активних речовин трави рути садової”** наведено результати вивчення хімічного складу, кількісного визначення та виділення в індивідуальному стані біологічно активних речовин рослин роду Рута.

В результаті фітохімічного аналізу в траві рути садової встановлена наявність флавоноїдів, аскорбінової і органічної кислот, кумаринів, гідроксикоричних кислот, вільних цукрів і водорозчинних полісахаридів.

Методом високоефективної рідинної хроматографії у траві рути садової ідентифіковано та встановлено вміст 18 речовин: 6 флавоноїдів (апигенін, рутин, кверцетин, лютеолін, ізокверцитрин, гіперозид), 4 гідроксикоричних кислоти (хлорогенова, розмаринова, кавава, *n*-кумарова), 2 кумарини

(кумарин, скополетин), 6 танінів: (галова та елагова кислота, галокатехін, епігалокатехін, епікатехін, епікатехін галат).

В індивідуальному вигляді виділено і встановлено структуру 9 речовин фенольної природи.

Методом хромато-мас-спектрометрії в траві рути садової ідентифіковано 16 жирних кислот з них 11 насичених (капринова, лауринова, міристинова, пальмітинова, маргарінова, стеаринова, арахінова, пентадеканова, бегенова, фітинова, лігноцеринова), 1 ненасичена (7-гексадеценева), 2 мононенасичені (пальмітолеїнова, олеїнова) та 2 поліненасичені (лінолева, ліноленова) жирні кислоти.

Методом хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад ефірної олії трави рути садової. Виявлено 34, з них ідентифіковано 20 сполук, що представлені спиртами, альдегідами та кетонами. Основними компонентами ефірної олії надземної частини рослини є ундеканон-2, нонанол-2 ацетат, ундеканол-2 ацетат, нонанон-2.

Для ефірної олії рути садової прикарпатського регіону характерне співвідношення кетонів: метилнонілкетон – метилгептилкетон (3 : 1), саме співвідношення цих кетонів (ундеканона-2 і нонанона-2) може бути маркером українського виду. Для ефірних олій рути різного походження характерні інші співвідношення, наприклад, для іранської ефірної олії трави рути садової (4 : 1), а для малайзійської – (1,7 : 1).

Одержано фракції водорозчинних полісахаридів, пектинових речовин, геміцелюлози А і Б з надземних органів рути садової, в яких виявлено: глюкозу, фруктозу, рамнозу, ксилозу.

У результаті проведеного хроматографічного аналізу у траві рути садової виявлено: методом паперової хроматографії 11 амінокислот, методом газової хроматографії – 17 амінокислот.

Встановлено кількісний вміст суми поліфенолів, кумаринів, флавоноїдів, окислювальних фенолів, аскорбінової та органічних кислот в траві рути садової від року заготівлі та варіанту внесення добрив.

За результатами дослідження встановлено, що заготівлю сировини рути садової доцільно проводити під час масового цвітіння 3 року вегетації, де накопичується максимальний вміст біологічно активних речовин.

Четвертий розділ “Виділення комплексів біологічно активних речовин з трави рути садової та розробка лікарської форми” присвячено розробці технології одержання біологічно активних субстанцій з трави рути

садової, зокрема, визначенню оптимальних умов виділення БАР, вибору екстрагенту, встановленню показників якості густого екстракту рути садової, а саме опис, ідентифікація, залишкові кількості органічних розчинників, втрата в масі при висушуванні, загальна зола, важкі метали, мікробіологічна чистота та кількісне визначення діючих речовин. В розділі представлено вивчення гострої токсичності та фармакологічної активності екстрактів трави рути садової. Автором встановлено, що досліджувані екстракти не токсичні, проявляють антимікробну та протизапальну дію. Виявлено, що екстракти РС-9, РС-9,6, РС-4 проявляли помірну бактеріостатичну дію щодо паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори та антифунгальну активність відносно *Candida albicans*. Встановлено, що РС-7 має виражену антимікробну дію та антифунгальну дію щодо *Candida tropicalis* і *Aspergillus niger*. На експериментальному рівні аргументовано можливість розробки лікарської форми з вираженою мікробіологічною активністю на основі екстракту РС-7. Стандартизацію екстракту РС-7 проводили за показниками розробленого проекту МКЯ «Рути садової трави екстракт густий»: опис, ідентифікація, залишкові кількості органічних розчинників, втрата в масі при висушуванні, загальна зола, важкі метали, мікробіологічна чистота та кількісне визначення діючих речовин.

Дисертантом обґрунтовано вибір мажевої основи, запропоновано склад та опрацьовано технологію виготовлення мазі з екстрактом трави рути садової; проведено оцінку якості розробленої мазі. Встановлено, що у розробленої лікарської форми відсутній токсичний вплив на організм тварин. Встановлено високу антифунгальну активність мазі до *Candida albicans* та помірну антимікробну активність щодо *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Proteus vulgaris*.

Розділ п'ятий “Культивування рути садової та розробка проекту методик контролю якості на сировину” присвячено особливостям культивування, заготівлі, первинної обробки і сушіння трави рути садової, які введено до проекту інструкції із заготівлі та сушіння трави рути садової.

Для діагностики ЛР і ЛРС рути садової (*Ruta graveolens* L.) автор проводить порівняльне морфолого-анатомічне дослідження досліджуваного об'єкту та *Ruta divaricata* Ten. та встановлює відмінні морфолого-анатомічні ознаки рути садової, на основі яких розробляє проект МКЯ на траву рути.

Результати дослідження наочно показують, що умови культивування рути садової: глибина обробітку ґрунту, спосіб сівби, норма висіву насіння,

глибина загорання насіння, мінеральні добрива – $N_{30}P_{90}K_{90}$ у встановлених дозах суттєво впливають на показники урожайності, показники доброякісності сировини, у тому числі на кількісний вміст БАР.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено інформаційно-патентний пошук за темою дисертаційної роботи, здійснено аналіз наукових даних із питань сучасних досліджень за проблематикою, що став підґрунтям до вибору об'єкта дослідження.

Виділено та ідентифіковано сполуки, встановлено кількісний вміст основних груп БАР рути садової, який коливається в залежності від фази вегетації, року заготівлі та варіанту внесених добрив.

Розроблено оптимальні параметри одержання екстрактів трави рути садової та проведено їх стандартизацію. Визначено діагностичні макро- і мікроскопічні ознаки досліджуваної сировини, які було введено до проекту МКЯ сировини.

Проведено дослідження способів розмноження рути садової, розроблено рекомендації з обробки ґрунту, строків посіву, догляду за рослинами; встановлено урожайність сировини і вивчено можливість культивування її в умовах Прикарпаття. Автором розроблено «Інструкцію із заготівлі та сушіння трави рути садової», розроблено проекти методів контролю якості на «Рути садової трава», «Рути садової трави екстракт густий».

Результати експериментальних досліджень самостійно проаналізовано та систематизовано, оформлено у вигляді таблиць, рисунків, діаграм, актів впровадження, проектів МКЯ, фотознімків. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача відображено у списку публікацій.

Зауваження і пропозиції. Результати роботи вірогідні, статистично перевірені, висновки, зроблені на їх основі, не викликають заперечень. Автореферат дисертації повністю висвітлює її зміст.

В цілому робота відрізняється стилістичною виваженістю, матеріал викладено послідовно і логічно, доцільно супроводжується ілюстраціями у вигляді схем, фотознімків, таблиць та діаграм.

Однак зустрічаються граматичні помилки і неточності, є некоректні бібліографічні посилання на літературні джерела, наприклад 18 та 21, що, ймовірно, можна віднести до технічних друкарських помилок.

Дисертаційна робота перенавантажена детальними описами метеорологічної та ґрунтової характеристики умов культивування – подібна різнопланова об’ємна інформація ускладнює сприйняття дисертації. Так, у підрозділі 5.5. (Розділ 5) «Фенологічні спостереження за розвитком рути садової» наведено аналіз формування вегетативних та генеративних пагонів і тривалість життя материнського куща. Проте автор приводить опис кожного етапу органогенезу рослини, який, по суті, відображений у фотознімках та таблицях.

Відомо, що у різних країнах види роду *Ruta* активно вивчаються як можливі джерела біологічно активних сполук. У зв’язку з цим виникають питання, які можливо віднести до дискусійних:

- які особливості при заготівлі трави рути садової були відмічені Вами, чи не варто було їх ввести до інструкції із заготівлі та сушіння;
- Вами здійснено моніторингові спостереження протягом чотирьох років за змінами показників якості сировини та вмістом кумаринів, на основі цього зроблено висновок про придатність сировини протягом 2 років. Виникає питання, чи плануєте Ви проведення моніторингу за змінами у складі та вмісті біологічно активних речовин в інших умовах зберігання;
- за якими методиками опрацьовано умови вирощування рути садової, чи повністю відповідають вони вимогам «Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження»;
- вплив абіотичних факторів на хімічний склад та якість сировини рути садової, вирощеної в умовах Прикарпаття, доречно було надати у вигляді діаграм;
- результати фенологічних досліджень, що провів дисертант стосовно рути садової, доцільно було кореляційно пов’язати з фармакогностичними показниками доброякісності сировини.

Проте ці зауваження і побажання мають в основному технічний характер і не впливають на основні положення та висновки, наведені в роботі.

Відповідність дисертації вимогам «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника»

Експериментальні дослідження виконані на достатньому науковому рівні з застосуванням сучасних методів аналізу. Достовірність одержаних результатів підтверджено за допомогою методів математичної статистики.

Дисертаційна робота є самостійною, завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують поставлені завдання, у тому числі основне з них – створення на основі біологічно активних сполук рути садової лікарських субстанцій різної спрямованості фармакологічної дії. В опублікованих наукових працях результати досліджень представлені з достатньою повнотою. Дисертація має теоретичну новизну і практичне значення.

Вважаю, що дисертаційна робота Мельник Марії Володимирівни «Фармакогностичне дослідження рослин роду Рута» за своєю науковою новизною, об'ємом проведених досліджень, сучасним рівнем виконання і рівнем впровадження відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів» (затвердженого постановою КМ України від 24 липня 2013 р. N 567 із змінами, внесеними згідно з постановами КМ №656 від 19.08.2015р. і №1159 від 30.12.2015р), які ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:
професор кафедри фармакогнозії
Національного фармацевтичного
університету,
доктор фармацевтичних наук,
професор



Ковальова А. М.

21. 11. 2016

Підпис професора Ковальової А.М.
засвідчую:

Заступник ректора
з питань кадрової роботи



Подстрелова З. Ф.