

ВІДГУК

офіційного опонента доктора фармацевтичних наук, професора Ковальнової А. М. на дисертаційну роботу Свірської Софії Петрівни «Фармакогностичне дослідження рослин роду Воловик», представлену на офіційний захист 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.

Обґрунтування вибору теми дослідження автором виконано на основі історичних даних, результатах експериментальних досліджень закордонних дослідників хімічного складу та фармакологічної активності рослин роду Воловик та досвід використання у народній медицині. В Україні практично відсутні детальні дослідження будови, біологічних особливостей зростання, ресурсів, хімічного складу та фармакологічної активності рослин роду Воловик.

Дійсно, види роду Воловик є цінним джерелом біологічно активних речовин. У світовій флорі налічується 51 вид *Anchusa* L. .В Україні зростає 11 видів роду Воловик: *Anchusa officinalis* L., *Anchusa procera* Bess., *Anchusa Gmelini* Ledeb., *Anchusa leptophylla* Roem. et Schult., *Anchusa ochroleuca* M. B., *Anchusa pseudoochroleuca* Shost., *Anchusa. italica* Retz. син. *Anchusa azurea* Mill., *Anchusa Barrelieri* (All.) Vitm., *Anchusa thessala* Boiss. et Sprun., *Anchusa pusilla* Gusul. та *Anchusa stylosa* M. B.

Тому дисертант усі види роду Воловик досліджує морфологічно та визначається на двох видах – *Anchusa officinalis* L. та *Anchusa procera* для детального комплексного дослідження і створення препаратів. Отже, тему дисертаційної роботи Свірської Софії Петрівни науково обґрунтовано і вона є актуальною для фармацевтичної науки.

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

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Проблемної комісії «Фармація» МОЗ і АМН України (протокол № 73 від 21.12.2011 р.), вона є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету: «Дослідження деяких дикорослих і культивованих лікарських рослин західного регіону України та розробка лікарських засобів на їх основі» (№ державної

реєстрації 0110U006205) та «Дослідження культивованих і дикорослих лікарських рослин західного регіону України та розробка технологій їх застосування з лікувальною метою» (№ державної реєстрації 0118U003809).

Наукова новизна одержаних результатів. Автором вперше проведено комплексне фітохімічне дослідження сировини воловика лікарського та воловика високого, вивчено їх фенольні сполуки, карбонові кислоти, вуглеводи, тритерпеноїди, стероїди, макро- та мікроелементи. Автор порівнює одержані результати з опублікованими раніше роботами по цьому об'єкту, відмічаючи при цьому новизну своїх результатів.

У траві воловика лікарського з використанням методу адсорбційної хроматографії на силікагелі та поліамідному сорбенті вперше виділено в індивідуальному стані 20 сполук. На основі фізико-хімічних властивостей ці сполуки ідентифіковані як: 3 фенолкарбонові кислоти, 3 гідроксикоричні кислоти, 6 флавоноїдів, 4 тритерпеноїди, 1 стероїдна сполука, 2 хлорофіли і 1 азотовмісна сполука. У сировині воловика лікарського з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії вперше визначено 14 сполук фенольної природи: 3 гідроксикоричні кислоти, 4 флавоноїди та 7 танінів. У траві воловика лікарського з використанням методу газової хроматографії з мас-спектрометрією вперше виявлено 4 фітостероли: ситостерол, кампестерол, стигмаста-5,24(28)-дієн-3-ол, стигмастерол та 7 жирних кислот: лінолеву, ліноленову, пальмітинову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову; у леткій фракції трави визначено 12 сполук: 2 кетони, 2 похідних сесквітерпену, 2 спирти, 1 ароматична сполука, 2 аліфатичні вуглеводні та 3 альдегіди. У сировині воловика лікарського та воловика високого з допомогою методу атомно-абсорбційної спектрометрії вперше досліджено 19 макро- та мікроелементів. У траві та коренях воловика лікарського та воловика високого вперше встановлено кількісний вміст окиснюваних фенолів – 1,85 % до 3,53 %, органічних кислот – 1,39 – 2,39 %, суми поліфенолів – 2,23 – 3,81 %, танінів – 1,01 – 2,14 %, флавоноїдів – 0,21 – 0,45 %, гідроксикоричних кислот – 1,09 – 2,19 %, полісахаридів – 0,71 – 8,40 %, слизу – 0,77 – 4,12 %. Із сировини воловика лікарського вперше виділено та досліджено фракції полісахаридів. Вперше експериментально обґрунтовано параметри екстракції БАР трави воловика лікарського, одержано екстракти, мазь з екстрактом воловика лікарського та досліджено їх фармакологічну активність. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 125931 «Спосіб одержання екстракту трави воловика лікарського з протизапальною активністю». Вперше встановлено та складено характеристики місць зростання

воловика лікарського та воловика високого в Івано-Франківській, Тернопільській, Закарпатській та Одеській областях, вивчено сировинні запаси видів та умови інтродукції воловика лікарського на Прикарпатті. Вперше встановлено відмітні діагностичні ознаки надземних органів воловика лікарського та воловика високого. На основі експериментальних досліджень встановлено параметри стандартизації трави воловика лікарського та термін її придатності.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментально доведено доцільність використання трави воловика лікарського як лікарської рослинної сировини та створено на її основі фітопрепарат – мазь з екстрактом воловика лікарського, яка проявляє ранозагоювальний ефект. На основі отриманих даних морфолого-анатомічного дослідження надземних органів воловика лікарського та воловика високого встановлено макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, які є критеріями для диференціювання цієї сировини. Розроблено проекти МКЯ «Воловика лікарського трава» та «Воловика лікарського екстракт сухий», проект інструкції із заготівлі та сушіння трави воловика лікарського.

За матеріалами дисертації видано монографію «Природа лікує... Рослини роду Воловик: ботанічна характеристика, склад та фармакологічна дія», основні положення роботи впроваджено в навчальний процес та наукову роботу кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету, кафедри хімії природних сполук Національного фармацевтичного університету, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри контролю якості і стандартизації лікарських засобів НМАПО імені П. Л. Шупика, кафедри фармації Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», кафедри фармакогнозії Одеського національного медичного університету, кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії і технології ліків ФПО Запорізького державного медичного університету, кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету, Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії Київського медичного університету, кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету, кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою ДВНЗ

«Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри медичного та фармацевтичного права, загальної і клінічної фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти та практичну роботу ТОВ «Фітолік» та випробувального центру державного підприємства «Івано-Франківськстандартметрологія». Додаються акти впровадження відповідно (Додатки).

Особистий внесок здобувача. Самостійно автором проведено інформаційно-патентний пошук, встановлено та досліджено основні групи БАР у сировині видів роду Воловик, виділено та ідентифіковано 20 сполук трави воловика лікарського, встановлено діагностичні макро- і мікроскопічні ознаки надземних органів воловика лікарського та воловика високого, які використано для її стандартизації. Одержано екстракти, мазь з екстрактом трави воловика лікарського та досліджено їх фармакологічну активність. Досліджено запаси сировини воловика лікарського та воловика високого. Розроблено проекти МКЯ «Воловика лікарського трава» та «Воловика лікарського екстракт сухий», проект інструкції із заготівлі та сушіння трави воловика лікарського.

Одержані результати експериментальних досліджень дисертантом самостійно проаналізовано і систематизовано у вигляді таблиць, рисунків, фотознімків, проектів Методів контролю якості та актів впровадження. Особистий внесок здобувача в опублікованих працях вказано в списку публікацій.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність. У процесі виконання дисертаційної роботи застосовано актуальні та відтворювані методи фармакогностичного аналізу, зокрема вискоефективної рідинної хроматографії, адсорбційної хроматографії на силікагелі та поліамідному сорбенті, атомно-абсорбційної спектрофотометрії, газової хроматографії з мас-спектрометрією, спектрофотометрії в УФ- та видимій областях, а також технологічні, фармакологічні та ресурсознавчі методи. Визначальні положення дисертації базовані на результатах експериментальних досліджень і не викликають сумніву. Обсяг та аналіз наведених результатів досліджень є науково достовірними та достатніми для одержання обґрунтованих висновків.

Повнота викладених результатів дисертаційної роботи в опублікованих працях і авторефераті, а також їх апробації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, зокрема 6 статей у

наукових фахових виданнях, з яких 1 стаття в іноземному виданні, що входить до наукометричних баз, 1 патент України на корисну модель, 1 монографію, 4 статті та 4 тез доповідей у матеріалах конференцій, які показують апробацію роботи. Опубліковані праці та автореферат повністю відповідають сутності досліджень.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається з анотації українською та англійською мовами, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літературних джерел, щодо теми роботи, розділу з наведенням об'єктів, матеріалів та методів дослідження та трьох експериментальних розділів із результатами експериментальних досліджень дисертанта, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків.

Роботу викладено на 296 сторінках друкованого тексту, ілюстровано 73 таблицями та 38 рисунками. Список використаних джерел містить 253 найменування, з яких 128 кирилицею та 125 латиною.

У **вступі** (стор. 21-28) обґрунтовано актуальність обраної теми, визначено завдання досліджень, відзначено наукову новизну та практичну цінність одержаних результатів, особистий внесок здобувача, наведені відомості щодо апробації роботи, публікацій за темою дисертації, її структури та обсягу.

У **першому розділі** «Рослини роду Воловик – перспективне джерело біологічно активних речовин» (стор. 29-53) наведено ботанічну характеристику *Anchusa* L., дані про їх розповсюдження, дослідження хімічного складу, фармакологічної дії та застосування в медицині. Здобувач звертає увагу на відсутність в Україні наукових досліджень щодо особливостей морфологічної будови рослини роду Воловик, існуючих ресурсів, хімічного складу та фармакологічної активності видів роду *Anchusa* L., підкреслюючи, що роботи закордонних дослідників дають підставу вважати актуальним подальше фармакогностичне дослідження видів роду Воловик.

У **другому розділі** «Об'єкти, матеріали та методи дослідження» (стор. 54-83) представлено об'єкти дослідження, відомості про прилади і реактиви, подано методики, застосовані дисертантом для проведення експериментальної роботи: фенольні сполуки досліджено методом паперової хроматографії та високоефективної рідинної хроматографії, індивідуальні сполуки виділено з допомогою адсорбційної хроматографії на силікагелі та поліамідному сорбенті, органічні кислоти та амінокислоти досліджено з допомогою паперової хроматографії, вивчення полісахаридів проведено з допомогою гравіметрії, паперової та тонкошарової хроматографії, жирні кислоти, фітостероли та сполуки легкої фракції досліджено з допомогою

газової хроматографії з мас-спектрометрією, для кількісного визначення вмісту БАР в сировині застосовано титриметрію, гравіметрію та спектрофотометрію.

У третьому розділі «Фітохімічне дослідження рослин роду **Воловик**» (стор. 84-131) встановлено вміст БАР у сировині воловика лікарського та воловика високого: фенольних сполук, вуглеводів, тритерпеноїдів, стероїдів та карбонових кислот.

З використанням методу паперової хроматографії у сировині воловика лікарського виявлені 6 речовин фенольної природи, у сировині воловика високого виявлені: 5 сполук у траві та 4 сполуки у коренях, які за їх фізико-хімічними властивостями віднесено до флавоноїдів та гідроксикоричних кислот.

У сировині воловика лікарського виявлені (метод ВЕРХ): гідроксикоричні кислоти – розмаринова, кавова та ферулова – у траві, розмаринова та кавова – у коренях; флавоноїди: апігенін, лютеолін; ізокверцитрин – у траві, апігенін, лютеолін, кверцитрин, ізокверцитрин – у коренях; таніни: галова кислота, галокатехін, епігалокатехін, катехін, епікатехін, епікатехін галат, катехін галат. У сировині встановлено значний вміст розмаринової кислоти – 0,46 % від маси сухої сировини у траві воловика лікарського та 0,2 % у коренях.

З трави воловика лікарського виділено та ідентифіковано 20 сполук: 3 фенолкарбонові кислоти – *n*-гідроксибензойну, галову та протокатехову, 3 гідроксикоричні кислоти – кавову, ферулову та розмаринову, 6 флавоноїдів – апігенін, лютеолін, астрагалін, рутин, (+) катехін, ізокверцитрин, 4 тритерпеноїди – урсолову та олеанолову кислоти, олеанол-21-глюкопіранозид, олеанол-21-глюкопіранозидо-3-ксилопіранозид, 1 стероїдну сполуку – β -ситостерин, 2 хлорофіли – хлорофіл *a* та хлорофіл *b* та 1 азотовмісну сполуку – алантоїн.

Методом газової хроматографії з мас-спектрометрією у траві воловика лікарського визначено 4 фітостероли: кампестерол, стигмастерол, ситостерол, стигмаста-5,24(28)-дієн-3-ол; 7 жирних кислот: лінолеву, γ -ліноленову, пальмітинову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову; 12 сполук легкої фракції: спирти – 2-гептанол, 3-гептанол, ароматичний монотерпеноїд тимол, альдегіди – 2,4,5-триметилбензальдегід, гексадеканаль, α -гексацинамоний альдегід, кетони – 2-гептанон, нортерпеноїд β -іонон, похідні сесквітерпеноїдів – гексагідрофарнезиллацетон та фарнезиллацетон, аліфатичний вуглеводень октакозан та трициклічний сесквітерпеноїд лонгіфолен. У сировині встановлено значний вміст жирних кислот – 0,8 % від маси сухої

сировини, переважаючою за вмістом кислотою у траві воловика лікарського є ліноленова кислота – 0,26 % від маси сухої сировини.

З використанням методу атомно-абсорбційної спектроскопії вивчено елементний склад сировини воловика лікарського та воловика високого і встановлено вміст 19 елементів, зокрема виявлено значний вміст кальцію – 0,8 % та магнію – 0,15 % від маси сухої сировини.

Встановлено вміст водорозчинних полісахаридів, пектинових речовин, геміцелюлози А та геміцелюлози Б у траві та коренях воловика лікарського. Методами паперової та тонкошарової хроматографії досліджено мономерний склад виділених фракцій, який представлений глюкозою, фруктозою, рамнозою, ксилозою, арабінозою та галактураною кислотою.

Кількісний вміст груп БАР у сировині воловика лікарського та воловика високого визначено спектрофотометричним, титриметричним та гравіметричним методами. Встановлено, що кількісний вміст груп БАР більше відрізняється за видами сировини і менше – за місцем зростання видів, тобто, накопичення діючих речовин має виражену видову приуроченість.

Автором досліджено динаміку накопичення груп БАР у траві воловика лікарського в онтогенезі. Визначено, що вміст поліфенольних сполук та танінів є найвищим у фазі бутонізації рослини, окиснених фенолів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та органічних кислот – у фазу масового цвітіння, полісахаридів – у фазу плодоношення.

У четвертому розділі «Одержання, стандартизація екстракту воловика лікарського та розробка лікарської форми на його основі» (стор. 132-173) представлено результати експериментального визначення оптимальних умов отримання екстрактів з трави воловика лікарського: ступінь подрібнення сировини – 0,5 – 3 мм; екстрагенти – вода очищена, етанол 50 % і 70 %; співвідношення сировина : екстрагент – 1:10; тривалість разової екстракції – 30 хв; кратність екстрагування – 3 рази. Одержано сухі екстракти трави воловика лікарського, досліджено їх склад, встановлено фізико-хімічні властивості. Автором встановлено нетоксичність екстракту в умовах гострого експерименту (IV клас токсичності за К. К. Сидоровим), протизапальний, противиразковий та протимікробний ефекти. Спосіб одержання екстракту трави воловика лікарського із протизапальною активністю захищено патентом України на корисну модель № 125931. На основі одержаного екстракту розроблено склад та запропоновано мазь з ранозагоювальним ефектом. Дисертант встановлює VI клас токсичності мазі за К. К. Сидоровим, наводить характеристику отриманої мазі, обґрунтовує термін її придатності.

Сухий екстракт воловика лікарського стандартизовано згідно вимог ДФУ, та розроблено проект МКЯ «Воловика лікарського екстракт сухий».

У п'ятому розділі «Ресурсознавчі дослідження. Стандартизація сировини та розробка нормативної документації» (стор. 174-206) наведено порівняльну морфологічну характеристику 11 видів роду Воловик флори України і встановлено їх відмінні характеристики (Додаток Й). Досліджено умови зростання воловика лікарського та воловика високого у 4 областях України, їх сировинні запаси та умови інтродукції воловика лікарського на Прикарпатті. Встановлено, що воловик лікарський потребує освітлених, добре зволжених місць з нейтральними ґрунтами.

Диференціацію видів автор проводить за встановленими діагностичними ознаками надземних органів воловика лікарського та воловика високого – це морфологічні (довжина стебла, будова квіток та насіння) та анатомічні (форма клітин епідермісу стебла, типи волосків), що ілюстровано рисунками.

Експериментально встановлено параметри стандартизації трави воловика лікарського, а саме: вміст гідроксикоричних кислот – не менше 1,3 %, втрата в масі при висушуванні – не більше 11 %, загальна зола – не більше 16 % (у зв'язку з великою кількістю волосків на поверхні сировини), сторонніх домішок (пожовтілих, побурілих частин сировини) – не більше 5 %, інших сторонніх домішок – не більше 2 %.

На перший погляд дещо завищеним здається результат визначення загальної золи – до 16%, проте автор доречно пояснює цей показник значним опущенням сировини. І такі подібні рекомендації щодо загальної золи містяться у фармакопейних статтях, а саме: ДФУ, 2, 0, 2014 – *Malve folium* – не більше 18 %; *Urticae folium* – не більше 20 %; *Taraxaci officinalis herba cum radice* – не більше 17%; ФРБ – *Tussilaginis farfarae folia* – не більше 20 %; Ph. Eur., вид. 7.0 частина 1, 2010 – *Althaeae folium* – не більше 18%. За результатами моніторингових досліджень вмісту БАР у сировині в процесі її зберігання, встановлено, що оптимальним терміном придатності трави воловика лікарського є 3 роки. Базуючись на отриманих результатах розроблено проект МКЯ «Воловика лікарського трава».

- **Зауваження та пропозиції.** Дисертаційну роботу Свірської С.П. характеризують комплексний підхід до розв'язання проблеми, новизна досліджень, теоретичне та практичне значення; одержані експериментальним шляхом результати роботи є достовірними, висновки – обґрунтованими. Дисертант коректно посилається на формули та хроматографічні системи розчинників, які наведено у 2 розділі, що робить представлення матеріалу

більш лаконічним та легшим для сприйняття. Робота відрізняється правильною орфографією та науковою стилістикою.

Автореферат та публікації повністю висвітлюють суть роботи.

Проте, поряд із позитивною характеристикою дисертаційної роботи Свірської Софії Петрівни виникають питання та доцільним є такі зауваження.

- Виникає питання, яким чином у технологічному процесі одержання екстракту дисертанту вдалося позбутися нейротоксичних алкалоїдів, що містяться у всіх частинах воловика.

- Дисертантом вивчались також корені воловика лікарського, трава і корені воловика високого, проте незрозуміло, на якому етапі знаходяться ці дослідження, оскільки названі об'єкти можуть бути перспективними джерелами отримання БАР, наприклад, алантоїну, гідроксикоричних кислот, танідів.

- Неточність у класифікації алкалоїдів, так дитерпеновий алкалоїд консолідин віднесено до піролізидинових алкалоїдів, таких як циноглосин, інтермедин та ін. (табл.1.3).

- Ряд фрагментів фармакологічних досліджень, наприклад, морфологічні та гістологічні показники (рис. 4.3-4.13), а також ресурсознавчих пошуків, наприклад, карти локалітетів зростання воловика лікарського та воловика високого та опис рослинних асоціацій (рис. 5.1-5.2, табл. 5.1); кліматичні фактори за 10 років (рис. 5.3-5.6) логічно винести до додатків.

Рекомендації та пропозиції.

- Автором досліджено динаміку накопичення груп БАР у траві воловика лікарського в онтогенезі рослини. Поряд з цим автор наводить 10-ти річні спостереження за кліматичними змінами у Прикарпатті. Проте, доцільно було порівняти кліматичні фактори по рокам з особливостями морфології рослин та накопиченням БАР. Тобто настав час для здійснення багатофакторного аналізу впливу кліматичних факторів (температура повітря, вологість повітря, кількість днів з опадами, висота над рівнем моря, характер ґрунтів) на морфологічну будову рослини: її ріст, олістяність, кількість і величину квіток, а також на накопичення окремих груп БАР, на якісний та кількісний вміст сполук. Хоча автор (стор. 187) резюмує, що на розвиток рослини більше впливає чинник коливання температури повітря та дещо менше зволоження, проте це суб'єктивні висновки. У подальшому потрібно застосувати математичний факторний аналіз і встановити корелятивні зв'язки між ними.

- Автором створено підґрунтя для подальшого морфолого-таксономічного та хемотаксономічного дослідження представників флори

України. Тому доцільно узагальнити результати дисертаційної роботи у науковій праці, у якій продовжити цілеспрямований пошук лікарських рослин на основі сучасних методів фенетико- та хемотаксономії, що стане значним теоретично-практичним внеском у систематику рослин флори України та сучасну фітохімію.

Однак, вказані зауваження та пропозиції мають дискусійний та рекомендаційний характер та не змінюють науково-практичну значимість роботи.


Відповідність дисертації вимогам «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника». Приймаючи до уваги наукову новизну роботи, повноту викладення та значний обсяг матеріалів експериментальних досліджень, обґрунтовані висновки та практичне значення роботи, вважаю, що дисертаційна робота Свірської Софії Петрівни «Фармакогностичне дослідження рослин роду Воловик» є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р., а її автор – Свірська Софія Петрівна заслуговує присвоєння вченого 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



А. М. Ковальова

Підпис професора Ковальової А. М. засвідчую

Начальник відділу кадрів НФаУ



З. Ф. Подстрелова