

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора фармацевтичних наук, професора Марчишин Світлани Михайлівни на дисертаційну роботу Гузьо Наталії Миколаївни на тему: „Фармакогностичне дослідження парила звичайного" 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. Впродовж останніх років препарати на основі лікарської рослинної сировини набувають все більшої популярності у фармакотерапії багатьох захворювань. За статистикою ВООЗ, до 80 % населення планети віддають перевагу препаратам природного походження. Сьогодні у розвинених країнах світу лікарські засоби рослинного походження займають суттєву частину загального фармацевтичного ринку. Зокрема, частка фітопрепаратів у США становить близько 26 % внутрішнього ринку лікарських препаратів. У Німеччині частка зареєстрованих лікарських засобів рослинного походження становить близько 13 % від усіх зареєстрованих препаратів.

Інтерес становить відома в Україні рослина – парило звичайне (*Agrimonia eupatoria* L.) родини розові (*Rosaceae*), яка використовується у народній і традиційній медицині як протизапальний, спазмолітичний, жовчогінний, сечогінний та гепатопротекторний засіб. Даний вид розповсюджений по всій території України та внесений до Державного кадастру рослинного світу України як пріоритетний вид лікарських рослин, що потребує наукових досліджень.

Спираючись на вищезазначене, фармакогностичне дослідження парила звичайного, стандартизація його сировини, вивчення сировинних ресурсів, встановлення можливостей промислової заготівлі сировини та розробка лікарських засобів вітчизняного виробництва на основі біологічно активних речовин досліджуваної рослини є актуальним.

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

Дисертаційна робота виконана у відповідності до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України і є фрагментом 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» (номер державної реєстрації 0110U006205) та «Дослідження культивованих і дикорослих лікарських рослин Західного регіону України та розробка технологій їх застосування з лікувальною метою» (номер державної реєстрації 018U003809).

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертанткою вперше проведено комплексне фармакогностичне дослідження парила звичайного. У сировині, що вивчалася, встановлено наявність летких сполук, вуглеводів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, амінокислот, органічних кислот, макро- та мікроелементів.

Вперше у сировині парила звичайного методом ГХ-МС ідентифіковано і встановлено вміст компонентів летких сполук. Показано, що у значних кількостях серед ідентифікованих сполук містяться сесквітерпен β -каріофілен, його похідне каріофіленоксид, моноциклічний сесквітерпен гумулен та ациклічний сесквітерпен – β -фарнезен.

Методом ВЕРХ у траві парила звичайного ідентифіковано компоненти дубильних речовин – галокатехін, епігалокатехін, катехін, епікатехін, епікатехіну галат, вільні галова та елагова кислоти; флавоноїди – ізокверцитрин, неогесперидин, нарингенін, лютеолін; гідроксикоричні кислоти – гідроксифенілацетатна, кофейна, сирінгова, *n*-кумарова, ферулова, синапова, цинамова та хінна. Виявлено і встановлено вміст 6 органічних кислот – винної, піровиноградної, ізолимонної, лимонної, бурштинової, яблучної.

Автором виділено та встановлено кількісний вміст фракцій водорозчинних полісахаридів, пектинових речовин, геміцелюлози А і Б (Гц А

і Гц Б). Методом ГХ/МС встановлено мономерний склад полісахаридних комплексів парила звичайного трави.

У траві парила звичайного ідентифіковано 17 амінокислот, 9 з яких є незамінними. Домінуючими є аспарагінова кислота, гліцин, аланін, валін та лізин. Встановлено елементний склад досліджуваної трави.

Вперше мікрохімічними реакціями встановлено локалізацію дубильних речовин, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, слизу, пектинових речовин, які використано для ідентифікації лікарської рослинної сировини. Новизну досліджень підтверджено та захищено патентом України на корисну модель «Спосіб визначення локалізації гідроксикоричних кислот у рослинній сировині за допомогою мікрохімічної реакції» (№ 124069).

Досліджено фармакологічну активність сухих екстрактів парила звичайного трави, встановлено протизапальну та гепатопротекторну дію.

Новизну досліджень підтверджено патентом України на винахід «Спосіб одержання екстракту трави парила звичайного з гепатопротекторною активністю» (№ 108382) та патентом України на корисну модель «Спосіб одержання екстракту трави парила звичайного з гепатопротекторною активністю» (№ 82949).

Автором проведено ресурсознавчі дослідження парила звичайного, встановлено місця його зростання на територіях Івано-Франківської, Тернопільської, Вінницької, Хмельницької, Кіровоградської, Закарпатської та Львівської областей. Вперше вивчено запаси сировини парила звичайного в Івано-Франківській та Тернопільській областях на конкретних заростях.

Проведено стандартизацію рослинної сировини парила звичайного.

Практичне значення отриманих результатів. Дисертантом встановлено основні діагностичні ознаки трави парила звичайного, що дає можливість ідентифікації сировини.

Встановлено оптимальні параметри екстракції БАР та отримано 3 екстракти з трави парила звичайного. Доведено можливість використання екстракту трави парила звичайного (екстрагент - 40 % етанол *P*) як лікарського засобу з гепатопротекторною та протизапальною активністю.

Досліджено гостру токсичність, встановлено протизапальну, гепатопротекторну та антибактеріальну активність одержаних сухих екстрактів.

Розроблено проекти методів контролю якості «Парила звичайного трави екстракт сухий» та «Інструкції з заготівлі та сушіння трави парила звичайного».

Матеріали наукових досліджень впроваджено у навчальний процес кафедр закладів вищої освіти та практичну роботу випробувального центру державного підприємства «Івано-Франківськстандартметрологія».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність. Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі є достатньо обґрунтованими і достовірними. Це забезпечується використанням авторкою сучасних методів фармакогностичних, технологічних та фармакологічних досліджень об'єктів, підтвердженням достовірності та коректності отриманих результатів, їх практичним значенням.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті, а також їх апробації. За матеріалами дисертації опубліковано 23 наукові праці, у тому числі 9 статей (із них 5 - у фахових наукових виданнях України, 4 – у іноземних виданнях, у тому числі 1 у виданні Scopus), 1 патент України на винахід, 2 патенти України на корисну модель, 11 тез доповідей, отримано 1 раціоналізаторську пропозицію. Публікації та автореферат повністю відображають основний зміст роботи.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків. Дисертаційна робота викладена на 225 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту - 163 сторінки) та складається зі вступу, огляду літератури, чотирьох розділів, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та 20 додатків (24 с.). Робота ілюстрована 48 таблицями та 33 рисунками. Список використаної літератури містить 220 джерел, з яких – 60 латиницею.

Дисертаційна робота починається з **анотації**, яка оформлена згідно до вимог наказу № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

У **першому розділі** автором наведено узагальнені дані наукових джерел стосовно ботанічної характеристики та розповсюдження парила звичайного, хімічного складу, фармакологічних властивостей та застосування в медицині.

Другий розділ присвячений обговоренню об'єктів та методів проведення фітохімічних, технологічних, фармакологічних, гістохімічних, статистичних та ресурсознавчих досліджень, приладів, матеріалів, методик і реактивів, використаних при виконанні експериментальної частини.

У **третьому розділі** наведено результати вивчення хімічного складу та кількісного визначення біологічно активних речовин парила звичайного.

Методом ГХ/МС встановлено якісний склад та визначено кількісний вміст компонентів летких сполук досліджуваних органів парила звичайного. В листках було ідентифіковано 49 речовин, що становить 75,38 % від їх загальної кількості; у квітках – 41 речовину (91,11 % від їх загальної кількості); у плодах – 49 (79,03 % від їх загальної кількості); у стеблах – 50 ідентифікованих речовин, що становить 80,65 % від загальної кількості виявлених компонентів. Серед ідентифікованих сполук найбільшу частку становлять сесквітерпен β -каріофілен та його похідне каріофіленоксид, моноциклічний сесквітерпен – гумулен та ациклічний сесквітерпен – β -фарнезен, які обумовлюють специфічну фармакологічну активність препаратів парила звичайного. В усіх частинах рослини присутні монотерпен ліналоол; сесквітерпени – неролідол, σ -кадінен, γ -кадінен. Крім моно- та сесквітерпеноїдів, було виявлено жирні кислоти, аліфатичні альдегіди, спирти тощо.

Досліджено полісахаридні комплекси з трави, стебел, листків і квіток парила звичайного, заготовленого з різних місць зростання, виділено фракції ВРПС, ПР, Гц А, Гц Б, кількісний вміст яких коливався в межах від 2,99 % до 3,95 %; від 5,05 % до 5,99 %; від 19,55 % до 21,36 % та від 3,16 % до 4,03 %

відповідно. Методами ПХ і ТШХ у гідролізаті водорозчинних полісахаридів трави парила звичайного ідентифіковано глюкозу і галактозу, у гідролізаті пектинових речовин – галактозу і кислоту галактуронову, у гідролізаті геміцелюлоз – ксилозу, арабінозу та галактуронову кислоту.

Методом ГХ/МС досліджено якісний склад і кількісний вміст моноцукрів у парила звичайного трави. Виявлено 11 вільних цукрів, ідентифіковано 3 – D-глюкозу, D-галактозу і D-фруктозу. Після кислотного гідролізу встановлено наявність та визначено кількісний вміст 17 моноцукрів, ідентифіковано 8 – D-рамнозу, L-арабінозу, D-ксилозу, D-манозу, D-глюкозу, D-галактозу, D-манітол і дулцітол. Домінує D-глюкоза, її вміст становив 23,88 мг/г.

Кількісне визначення танінів і поліфенолів у траві парила звичайного проведено спектрофотометричними методами у перерахунку на пірогалол за методикою ДФУ 2.0. Вміст танінів у сировині парила звичайного коливався в межах 1,67 % – 2,10 %, поліфенолів – в межах 4,00 % – 4,15 %, залежно від місця зростання. Методом ВЕРХ на хроматографі *Agilent 1200 3D LC System Technologies* (США) проведено визначення компонентів дубильних речовин у парила звичайного трави.

Спектрофотометричним методом визначено кількісний вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот. Встановлено, що в період масового цвітіння в траві парила звичайного накопичується 4,09 – 4,44 % флавоноїдів і 2,45 % – 2,89 % гідроксикоричних кислот у залежності від місця зростання рослин.

У парила звичайного трави виявлено і визначено кількісний вміст 12 елементів – 4 макро- і 8 мікроелементів. 3 макроелементів ідентифіковано К, Са, Mg, Na, з мікроелементів – Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Se, Cr, Si. Спостерігали значний вміст серед макроелементів – К (22921 мг/кг), серед мікроелементів – Fe (349 мг/кг). Вміст важких металів знаходився в дозволених межах (ДФУ 2.0 – 2.4.27).

У четвертому розділі наведено результати одержання сухих екстрактів з парила звичайного трави. Встановлено, що перспективною субстанцією для розробки лікарської форми з гепатопротекторною активністю є екстракт

парила звичайного трави (екстрагент – 40 % етанол *P*), стандартизацію якого проводили за вимогами ДФУ 2.0.

Комплекс проведених досліджень з вивчення гострої токсичності показав, що сухі екстракти парила звичайного трави відносяться до практично нетоксичних речовин (V клас токсичності) при внутрішньошлунковому введенні ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

В експериментах на щурах дисертантом досліджено протизапальну активність екстрактів парила звичайного трави. Встановлено, що найкращу протизапальну активність через 1 год проявив сухий екстракт трави парила звичайного (екстрагент – 40 % етанол) в дозі 10,0 мг/кг, зменшуючи набряк на 66,19 %.

Гепатопротекторну активність екстрактів трави парила звичайного вивчали на скринінговій моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту.

Методом активної дифузії речовини в агар із застосуванням паперових дисків у дослідях *in vitro* доведена антимікробна активність екстрактів парила звичайного трави відносно бактерій *Esherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27923.

П'ятий розділ присвячено вивченню анатомічної будови парила звичайного та ресурсознавчим дослідженням. Методом скануючої електронної мікроскопії встановлено мікроскопічні діагностичні ознаки сировини парила звичайного.

Гістохімічними реакціями ідентифіковано та встановлено локалізацію дубильних речовин, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, слизу та пектинових речовин у тканинах і клітинах парила звичайного, що є важливим при встановленні тотожності та доброякісності лікарської рослинної сировини.

Автор дослідила розповсюдження парила звичайного на території Івано-Франківської, Тернопільської, Хмельницької, Львівської, Кіровоградської, Вінницької, Черкаської, Київської, Закарпатської областей та в автономній республіці Крим і встановила, що в різних місцях зростання

у Івано-Франківській і Тернопільській областях середня урожайність надземної частини парила звичайного становить 3,58 – 21,00 г/м² повітряно-сухої сировини. Обсяг можливих щорічних заготівель трави на встановлених заростях 28,41 – 71,30 кг.

Дисертант робить висновки, що запаси сировини парила звичайного достатні для промислової заготівлі як можливої лікарської рослинної сировини.

На основі проведеного товарознавчого аналізу сировини парила звичайного автор розробила проект «Інструкції із заготівлі та сушіння трави парила звичайного».

На завершення дисертант робить цілком логічно обґрунтовані, чітко сформульовані висновки, виявляючи достатній рівень наукової ерудиції.

Список використаних джерел оформлено за чинними вимогами, містить 220 джерел (60 – іноземні).

Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертацій.

Оформлення автореферату і дисертації відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.17 р. Автореферат цілком відповідає тексту дисертації.

Робота написана логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту та технічного оформлення, відповідає вимогам МОН України. Тексти дисертації та автореферату викладено українською мовою із дотриманням наукового-стилю. Істотних недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено.

Поряд з позитивними характеристиками роботи необхідно відмітити деякі зауваження та пропозиції:

1. Вважаю, що при визначенні дубильних речовин дисертант посилається не лише на Державну фармакопею України, використовуючи сучасні методи дослідження, а також на ДФ СРСР XI видання (перманганатометричний метод).

2. На мою думку, у розділі 2 не було необхідності детально описувати методики визначення ряду БАР та елементів, а дати посилання на певні джерела літератури або ДФУ.

3. У списку літератури наведено джерела, опубліковані понад 10 років тому.

4. У роботі зустрічаються поодинокі орфографічні та стилістичні помилки, невдалі вирази.

Проте перелічені зауваження не є принциповими, мають редакційний характер і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

У порядку наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповіла на такі запитання:

1. Які, на Вашу думку, БАР парила звичайного визначають їх фармакологічну активність: протизапальну, гепатопротекторну, антимікробну?

2. Які на фармацевтичному ринку України є препарати, до складу яких входить парило звичайне?

3. Обґрунтуйте, будь ласка, вибір референс-препарату «Силібор» при визначенні гепатопротекторної дії сухого екстракту з трави парила звичайного.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Згідно Державного Реєстру лікарських засобів України асортимент гепатопротекторних засобів вітчизняного виробництва є обмеженим. Тому, оскільки сухий екстракт парила звичайного трави виявив виражену гепатопротекторну дію та низьку токсичність, було б доцільно провести подальші поглиблені фармакологічні дослідження та здійснити пошук зацікавленого виробника для впровадження у промислове виробництво одержаного засобу.

Відповідність дисертації вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів». На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота Гузьо Наталії Миколаївни на тему «Фармакогностичне дослідження

парила звичайного» є самостійною, закінченою кваліфікаційною науково-дослідною працею, в якій отримані нові результати, що обґрунтовують можливість застосування парила звичайного трави з метою створення нових вітчизняних лікарських засобів. За актуальністю обраної теми, новизною одержаних результатів, практичним значенням, обсягом проведених досліджень, рівнем їх виконання, обґрунтованістю наукових положень і рекомендацій, повнотою викладу результатів роботи у фахових виданнях, дисертація відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), а її автор Гузьо Наталія Миколаївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент :

Завідувач кафедри фармакогнозії з
медичною ботанікою Тернопільського
національного медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України,
доктор фармацевтичних наук, професор



Марчишин С. М.

Особистий підпис _____

Заступник ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету

