

ВІДГУК

офіційного опонента д.фарм.н., професора Антонюка В.О.
на дисертаційну роботу Шанайди Марії Іванівни «**Фармакогностичне дослідження представників підродини *Nepetoideae* Burnett. родини *Lamiaceae* Martinov як джерела одержання лікарських засобів**»,
представлену до спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 при Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Актуальність обраної теми досліджень та зв'язок її з науковими програмами, планами та темами

Значний інтерес у плані фармакогностичного вивчення становить велика родина Глухокропівові (*Lamiaceae*), яка, окрім значної кількості офіциальних лікарських рослин, налічує десятки перспективних для подальших досліджень видів. У світовій флорі родина Глухокропівові налічує близько 8 тисяч видів, які належать до 245 родів, поширених у різних кліматичних зонах Земної кулі. Більшість представників родини поширені в більш теплих країнах, в Україні описано лише 41 рід і 150 видів рослин родини Глухокропівові. Однак цілий ряд представників Глухокропівових успішно інтродуковано в ґрунтово-кліматичних умовах лісостепової зони України, що відкриває перспективу їх подальшого культивування та наукового дослідження. Це, зокрема, представники підродини *Nepetoideae* іноземного походження: види родів *Lophanthus*, *Hyssopus*, *Satureja*, *Monarda*, *Dracocephalum*, *Ocimum* тощо.

До основних груп біологічно активних речовин (БАР) рослин родини належать терпеноїди та поліфеноли, що виявляють декілька видів біологічної активності, які є вагомими у профілактиці та лікуванні багатьох захворювань. Десятки видів родини використовуються в науковій та народній медицині. Разом з тим, літературні дані свідчать про неоднакову ступінь вивчення хімічного складу і біологічної активності лікарських рослин родини. В аптеках України наявні сировина, монопрепарати та комплексні лікарські засоби на основі сировини більш ніж десяти видів Глухокропівових, зокрема: материнки звичайної, меліси лікарської, м'яти перцевої, лаванди колоскової, шавлії лікарської, чебрецю звичайного, ч. повзучого, собачої кропиви звичайної та п'ятилопатевої, ортосифону тичинкового, гісопу лікарського, васильків справжніх, чаберу садового та ін.

До другого видання ДФУ включено ще більш широкий список видів лікарських рослин цієї родини, тому, очевидно, що представники цієї родини представляють практичний інтерес. За цих умов дослідження та впровадження у практику рослин, що мають виражену протизапальну, антисептичну та седативну дію є важливим завданням сучасної фармацевтичної науки, а дисертаційна робота Шанайди М.І. є своєчасною і актуальною.

Тематика обраного напрямку досліджень відповідає плану науково-дослідних робіт кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського і, зокрема, є

фрагментом тем: «Фармакогностичний аналіз та вивчення фармакологічної дії біологічно активних речовин лікарських рослин в експерименті» (№ Державної реєстрації 0108U001695); «Фармакоекономічне обґрунтування створення, отримання, розробки субстанцій лікарських речовин і лікарських засобів на основі продуктів хімічного синтезу й біологічно активних речовин рослинного походження, їх стандартизація та фармакологічне вивчення» (№ Державної реєстрації 0111U003756); «Фармакогностичне вивчення культивованих і дикорослих лікарських рослин; фізико-хімічні дослідження продуктів перетворення 1,3-диметилксантину та стандартизація, фармакологічні і фармакотехнологічні випробування лікарських засобів» (номер Державної реєстрації 0115U003359); «Пошук нових видів лікарських рослин, фармакогностичне та фармакологічне обґрунтування ефективності їх біологічно активних речовин» (номер Державної реєстрації 0118U004982). Робота виконана у відповідності до плану роботи проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України (протокол № 68 від 20.04.2011 р.).

Наукова новизна отриманих результатів

Одержані дисертанткою результати дозволяють теоретично обґрунтувати та практично вирішити питання розробки та стандартизації лікарських засобів з представників рослин підродино Котовникові родини Глухокропивові, а також уперше вирішити проблему комплексного використання ряду рослин цієї підродино, так як поряд з отриманням ефірної олії показана можливість використання післядистиляційних вичавок для одержання ряду цінних БАР.

Основними теоретичними здобутками дисертації є нові методологічні підходи до вивчення неофіціальних видів підродино Котовникові, в основу яких покладено результати критичного аналізу наукових першоджерел, скринінгові фітохімічні дослідження інтродукованих в Україні видів, визначення особливостей накопичення ефірних олій та інших груп БАР.

У досліджуваних об'єктах вперше ідентифіковано 239 сполук, які належать до різних класів БАР. Вперше встановлено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у сировині досліджуваних видів. Визначено ароматичні кислоти, кумарини, флавоноїди, дубильні речовини. Вперше встановлено вміст 6 тритерпенових сполук. Отримано нові дані щодо компонентного складу ефірних олій досліджуваних видів; загальна кількість ідентифікованих в ефірних оліях компонентів - 134. У різних об'єктах визначено від 21 до 53 компонентів ефірних олій. В аналізованих ефірних оліях визначено домінуючі та видоспецифічні компоненти. На основі цих даних визначено хемотипові особливості об'єктів дослідження.

Вперше отримано ліпофільні фракції із сировини досліджуваних видів та проведено аналіз вмісту хлорофілів і каротиноїдів у їх складі. Серед БАР первинного синтезу у траві рослин вперше визначено компонентний вміст 21 карбонової кислоти, 25 жирних кислот та 22 амінокислот.

Вперше обґрунтовано визначення розмаринової кислоти як спільної домінуючої сполуки сировини для видів монарди трубчастої, чаберу садового, васильків американських, змієголовника молдавського і лофанту анісового.

Шляхом використання комплексу методів досліджень - рідинно-рідинної екстракції, колонкової адсорбційної хроматографії, препаративної ТШХ та кристалізації - з трави монарди трубчастої вперше виділено 6 індивідуальних сполук. Структуру 4 з них - розмаринової кислоти, кофейної кислоти, рутину і β-ситостеролу - доведено за їх фізико-хімічними властивостями, даними УФ-спектрофотометрії, ¹H та ¹³C ЯМР спектроскопії, мас-спектрометрії та порівнянням із стандартними зразками сполук.

На основі макро- і мікроскопічного аналізу листків, стебел, квіток і суцвіть досліджуваних видів отримано нові дані, які дали змогу встановити комплекс їх морфолого-анатомічних діагностичних ознак. Ці результати використано для розробки проектів МКЯ «Лофанту анісового трава», «Монарди трубчастої трава», «Васильків американських трава», «Чаберу садового трава» та «Змієголовника молдавського трава».

Вперше встановлено антиоксидантну активність настоїв та ефірних олій із трави досліджуваних рослин. Розширено дані про діапазон антимікробної та протигрибкової активності ефірних олій васильків американських, лофанту анісового, монарди трубчастої, змієголовника молдавського та чаберу садового.

Вперше розроблено технологію одержання настоек з трави васильків американських та змієголовника молдавського; рідкого і густого екстрактів із трави чаберу садового; сухих екстрактів з трави лофанту анісового, монарди трубчастої та васильків американських. В експерименті на тваринах доведено безпечність отриманих лікарських рослинних засобів (ЛРЗ). Вперше визначено протизапальну активність густого екстракту з трави чаберу садового, сухих екстрактів з трави лофанту анісового, монарди трубчастої та васильків американських; анальгетичну активність густого екстракту із трави чаберу садового та сухого екстракту із трави монарди трубчастої; гепатопротекторну дію рідкого екстракту із трави чаберу садового. Вперше встановлено седативний ефект ефірних олій та настоек із трави васильків американських та змієголовника молдавського. Здійснено всебічний аналіз та теоретичне обґрунтування можливих взаємозв'язків між вмістом основних БАР у розроблених ЛРЗ та їх біологічною активністю.

Наукову новизну проведених досліджень підтверджено 6 патентами України, з яких 2 - на винахід (№ 120826 від 10.02.2020 р.; № 120827 від 10.02.2020 р.) та 4 - на корисну модель.

Практичне значення отриманих результатів

Експериментально підтверджено перспективність створення ЛРЗ із трави 5 видів підродини Котовникові: васильків американських, змієголовника молдавського, лофанту анісового, монарди трубчастої та чаберу садового. Обґрунтовано доцільність використання всієї надземної частини досліджуваних об'єктів, яку слід заготовляти у період цвітіння.

Валідовано методику визначення вмісту розмаринової кислоти у траві рослин денситометричним методом на основі ВЕТШХ.

Технологічну схему одержання та проект МКЯ сухого екстракту з трави васильків американських апробовано в умовах виробництва ТзОВ «Терно-

фарм»; технологічну схему виробництва густого екстракту з трави чаберу садового під назвою «Сатурин» апробовано в промислових умовах хіміко-фармацевтичного заводу «Червона зірка». Запропонований проект МКЯ ефірної олії з трави чаберу садового апробовано в умовах виробництва ТзОВ «Косметико-фармацевтична компанія «Грін Фарм Косметик»». Розроблено та впроваджено у галузь охорони здоров'я інформаційний лист № 179-2016 «Макро- та мікроскопічні ознаки трави васильків американських (*Ocimum americanum* L.)».

Результати дисертаційних досліджень впроваджені у науково-дослідну роботу споріднених кафедр України, Польщі, Литви та Державної служби з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Тернопільській обл., а також Державної лабораторії з контролю якості лікарських засобів Державної установи «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Особистий внесок здобувача

Дисертація є самостійною завершеною науковою працею. Автором особисто визначено об'єкти дослідження, здійснено аналіз наукових джерел щодо поширення, хімічного складу і використання лікарських рослин родини Глухокропівові у народній і науковій медицині, визначено мету дослідження та шляхи її реалізації; здійснено планування та виконання експериментальної частини роботи, інтерпретацію та узагальнення отриманих результатів, формулювання основних положень та висновків, представлених до захисту.

Деякі розділи дисертаційної роботи виконані за часткової консультативної допомоги проф. Марчишин С. М., проф. Олещук О. М. доц. Сірої Л. М. та доц. Гудзь Н. І., про що вказано у дисертації та авторефераті.

Усі наукові узагальнення, висновки та рекомендації викладені автором у дисертації виконані автором особисто. У наукових працях, які були опубліковані у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

З кандидатської дисертації Шанайди М.І. [тема: Репродуктивна біологія видів роду *Salix* L. у зв'язку із зміною статі особин (в умовах Західного Поділля). - Київ, 2002] жодних запозичень немає.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації та їх достовірність

Встановлені автором наукові положення, висновки та рекомендації, наведені в дисертаційній роботі є повністю обґрунтованими і статистично достовірними та мають практичне значення. Вони забезпечені використанням сучасних фізико-хімічних, фармакогностичних, фармакологічних, технологічних методів дослідження вибраних об'єктів.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах та авторефераті

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 65 наукових робіт, у тому числі 30 статей у наукових фахових виданнях (22 у наукових фахових виданнях України, 8 у зарубіжних фахових виданнях, з яких 5 входять до наукометричної бази Scopus), 28 тез доповідей, 6 патентів України (з них 2 на винахід). Автореферат дисертації повністю розкриває основний зміст роботи.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків

Дисертаційну роботу викладено на 569 сторінках машинописного тексту, вона складається з анотації, вступу, семи розділів, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та 9 додатків. Обсяг основного тексту становить 309 сторінок. Роботу ілюстровано 173 рисунками і 91 таблицею. Перелік використаних джерел містить 402 найменування, з них 175 кирилицею та 227 латиною.

У розділі 1 висвітлено сучасний стан фармакогностичного вивчення представників родини Глухокропівові у світовій та вітчизняній літературі. Зроблено висновок про те, що розширення асортименту фітозасобів офіційної медицини за рахунок неофіціальних видів підродини Котовникові є своєчасним і актуальним.

У розділі 2 на основі критичного аналізу джерел наукової літератури визначено об'єкти та методологію проведення фармакогностичних досліджень. Об'єктами дослідження стали 10 видів (у тому числі 4 форми) рослин, які належать до підродини Котовникові. У цьому розділі також наведено матеріали, методики, реактиви та прилади, які були використані при проведенні досліджень.

Розділ 3 присвячений експериментальним дослідженням сполук первинного синтезу та елементного складу сировини досліджуваних рослин. Методом ГХ-МС у траві досліджуваних видів встановлено компонентний вміст 21 карбонової кислоти, аліфатичні карбонові кислоти в усіх видах переважають над ароматичними.

У траві досліджуваних об'єктів ВЕРХ встановлено вміст 22 амінокислот. Найвищий сумарний вміст амінокислот виявлено у траві виду роду васильки, де він становив 1,1 – 1,3%. Встановлено вміст фракцій полісахаридного комплексу у сировині досліджуваних видів, а також особливості накопичення 13 елементів у траві 10-ти досліджуваних видів.

Розділ 4 присвячений експериментальним дослідженням сполук вторинного синтезу у сировині досліджуваних рослин. Цим сполукам присвячений основний об'єм фітохімічних досліджень дисертантки.

У траві досліджуваних рослин ідентифіковано ефірні олії, тритерпеноїди, іридоїди, дубильні речовини, гідроксикоричні кислоти та флавоноїди. Досліджено особливості накопичення ефірних олій у надземній частині ряду досліджуваних рослин залежно від періоду вегетації та заготовленої для досліджень частини рослини. В ефірних оліях досліджуваних рослин методом ГХ/МС ідентифіковано від 23 до 57 сполук. Методом ВЕРХ у сировині досліджуваних рослин ідентифіковано та встановлено вміст шести сполук тритерпенової природи і декілька класів фенольних сполук (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини, кумарини). Використано сучасний метод високоефективної тонкошарової хроматографії - для визначення хроматографічних профілів флавоноїдів і гідроксикоричних кислот у сировині рослин та поетапного виділення індивідуальних сполук з

трави монарди трубчастої; достовірність проведених досліджень підтверджена десятками оригінальних фотографій отриманих хроматограм.

У розділі 5 наведено діагностичні морфолого-анатомічні ознаки сировини досліджуваних видів, які доповнено якісними кольоровими фотографіями їх мікро- та мікроскопічного аналізу. Визначені показники доброякісності сировини досліджуваних об'єктів внесено до відповідних проєктів МКЯ на сировину 5 видів.

У розділі 6 представлено результати визначення оптимальних параметрів екстрагування сировини досліджуваних видів з метою максимального вилучення БАР. На основі цих досліджень вперше запропоновано технологічні схеми отримання нових фітосубстанцій та розроблено відповідні проєкти МКЯ: настоек із трави змієголовника молдавського та васильків американських; густого екстракту з трави чаберу садового; сухих екстрактів з трави лофанту анісового, монарди трубчастої та васильків американських. Реалізовано комплексний підхід до переробки сировини васильків американських і монарди трубчастої після перегонки ефірних олій.

Розділ 7 присвячено вивченню біологічної активності отриманих фітосубстанцій. В умовах *in vitro* встановлено антимікробну активність ефірних олій досліджуваних видів щодо стандартних штамів хвороботворних мікроорганізмів. Встановлено кореляційні взаємозв'язки між вмістом суми фенольних сполук у досліджуваних водних витягах сировини рослин і їх антиоксидантною активністю. Наведено результати досліджень *in vivo* та інтерпретацію можливих взаємозв'язків між виявленими седативною, протизапальною, анальгетичною дією отриманих субстанцій і домінуючими БАР у їх складі.

Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації, завершеність дисертації в цілому

Характеризуючи дисертаційну роботу Шанайди Марії Іванівни у цілому, слід зазначити, що вона безперечно містить всі необхідні ознаки актуальності, наукової і практичної значущості. Відрізняється оригінальними сучасними підходами до виконання запланованих експериментальних досліджень.

Поряд з позитивною характеристикою роботи, необхідно відмітити окремі зауваження та пропозиції:

1. У огляді літератури декілька разів вказується, що відбувається звуження ареалів ряду досліджуваних рослин, але має пояснення, з яких причин це відбувається.

2. У таблицях 3.1- 3.11 – дець потрібно було б вказати, до сировини чи повітряно-сухої сировини відносяться одержані результати.

3. Висновки до дисертаційної роботи є дуже об'ємні, їх варто було б дещо скоротити.

4. Місцями у дисертації зустрічаються не зовсім вдалі вирази, наприклад, на стор 58 : «Сполуки вторинного синтезу виявляють значно вищу біологічну активність порівняно із первинними метаболітами, тому більш широко вивчаються та використовуються у медичній практиці [16, 81, 274]».

Вважаю, що це твердження дискусійне, адже первинні метаболіти, зокрема білкові речовини, дуже часто мають надзвичайно високу біологічну активність (згадаймо, наприклад, ферменти, дифтерійний, правцевий та інші токсини, білкову частину зміїної чи отрути комах). Відсутність використання більшості ферментів, білків, протеогліканів та інших первинних метаболітів в якості лікарських препаратів частіше пояснюється їх високою імуногенністю та складністю доставки в незмінному вигляді до цільового органу.

На стор. 72: «Найбільш активно вивчаються протиракові властивості флавонових та тритерпенових сполук, які накопичуються Глухокропиковими [242, 375]».

Це твердження також дискусійне і краще було б його викласти у іншій редакції.

Стор. 125 дисертаційної роботи: «Домінування ...макроелементу (кальцію) дослідниками встановлено у надземних органах ряду видів родини Глухокропикові за умови їх вирощування в Україні [4], Російській Федерації [132] та Польщі [199]».

Напевне, не буде різниці за умови їх вирощування в Білорусі, Литві, Словаччині та ряді інших країн. Краще було б це твердження викласти у іншій редакції.

Вважаю, що помічені неточності є незначними, не знижують дуже позитивного враження від дисертаційної роботи.

Відповідність дисертації вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів»

Дисертаційна робота Шанайди Марії Іванівни на тему «Фармакогностичне дослідження представників підродини *Nepetoideae* Burnett. родини *Lamiaceae* Martinov як джерела одержання лікарських засобів», на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за своєю актуальністю, науковою новизною, обсягом та рівнем досліджень, теоретичною та практичною значимістю, достовірністю отриманих результатів, публікаціями у фахових виданнях відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів» постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор, Шанайда Марія Іванівна, заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

Професор кафедри фармацевтичної,
органічної і біоорганічної хімії
Львівського національного медичного
університету ім. Данила Галицького



Підпис		В.О. Антонюк
Засвідчую		
Провідний фахівець відділу кадрів ЛМНУ ім. Данила Галицького		