

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора фармацевтичних наук, професора Ільїної Т. В. на дисертаційну роботу Легінь Надії Ігорівни на тему «Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.)», 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. Пошук нових сировинних джерел біологічно активних речовин (БАР), створення на їх основі ефективних лікарських засобів є актуальним завданням фармацевтичної науки.

Особливої уваги заслуговують лікарські рослини, які здавна використовуються в народній медицині. До таких рослин належить підлісник європейський (*Sanicula (S.) europaea* L.) родини Селерові (*Apiaceae* Lindl.), який застосовується у народній медицині України та ряду країн Європи як кровоспинний, протизапальний, ранозагоювальний, відхаркувальний, жовчогінний, в'язучий, сечогінний, седативний, антибактеріальний та протигрибковий засіб.

У офіційній медицині України підлісник європейський не використовується. Проте, монографію «*Sanicula europaea for homeopathic preparations*» наведено у Фармакопеї Франції 2005 року видання.

Дослідження хімічного складу рослини носять епізодичний характер. Експериментальні дослідження з отримання лікарських засобів та вивчення їх фармакологічної активності раніше не проводились.

Тому комплексне фармакогностичне дослідження підлісника європейського, стандартизація лікарської рослинної сировини (ЛРС), розробка технологій одержання лікарських засобів на основі БАР та встановлення їх фармакологічної активності є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота 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 0110 U 006205) та «Дослідження культивованих і дикорослих рослин західного

регіону України та розробка технологій їх застосування з лікувальною метою» (номер державної реєстрації 0118 U 003809).

Ступінь обґрунтованості наукових положень дисертації, висновків, сформульованих у дисертаційній роботі та їх достовірність. Дисертація Легінь Н. І. виконана на високому науковому рівні. Докладний аналіз наукової літератури підтвердив доцільність та актуальність проведення досліджень за напрямками, представленими в дисертації.

Представлена дисертаційна робота виконана з використанням як традиційних, так і сучасних методів аналізу: паперової хроматографії (ПХ), тонкошарової хроматографії (ТШХ), газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ-МС), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій областях спектра, атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС); макро- та мікроскопічних; ресурсознавчих; фармакологічних досліджень *in vitro* та *in vivo*.

Дисертантка послідовно і логічно викладає отримані результати, підтверджує їх рисунками хроматограм, даними кількісного визначення вмісту БАР, даними по отриманню екстрактів, їх стандартизації та підтвердженню фармакологічної активності.

Дисертаційна робота базується на достатньому фактичному матеріалі і за результатами експериментів повністю підтверджує поставлену мету дослідження. Ілюстративний матеріал підтверджує достовірність і значущість проведених експериментів.

Наукові положення аргументовані та мають належний рівень наукової новизни. Кількість наведених результатів досліджень, глибина їх аналізу, проведеного з застосуванням методів математичної статистики згідно з вимогами ДФУ, є науково достовірними та достатніми для одержання обґрунтованих висновків. Робота не містить плагіату.

Отже, високий ступінь обґрунтованості та достовірності отриманих результатів, рекомендацій і висновків, представлених у дисертації Легінь Н. І., не викликає сумнівів. Дисертаційна робота добре оформлена та має логічну структуру.

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертанткою вперше проведено фармакогностичне, фармакологічне та ресурсознавче дослідження підлісника європейського. Встановлено оптимальні умови одержання екстрактів, методики аналізу кількісного вмісту діючих речовин.

Вперше в результаті фітохімічного дослідження надземних та підземних органів підлісника європейського встановлено наявність основних груп БАР. Визначено кількісний вміст окиснюваних фенолів, суми поліфенолів, танінів, флавоноїдів, тритерпенових сапонінів, гідроксикоричних та органічних кислот, в тому числі кислоти аскорбінової, вітаміну K_1 .

Дисертанткою уперше у траві підлісника європейського ідентифіковано та визначено кількісний вміст 10 індивідуальних сполук фенольної природи, у тому числі 6 метаболітів танінів, 2 флавоноїдів, 1 кумарину та 1 гідроксикоричної кислоти; 3 фітостеролів та 13 компонентів ефірної олії; 9 жирних кислот; 17 амінокислот.

У кореневищах з коренями вперше ідентифіковано та визначено кількісний вміст 11 індивідуальних сполук фенольної природи, у тому числі 7 метаболітів танінів, 1 флавоноїду, 1 кумарину та 2 гідроксикоричних кислот; 17 амінокислот.

Вперше досліджено елементний склад трави та кореневищ з коренями підлісника європейського.

Вперше з трави підлісника європейського виділено в індивідуальному стані 6 гідроксикоричних кислот (кофейну, хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову, ферулову, *n*-кумарову) та 1 флавоноїд (рутин); з підземних органів – 5 гідроксикоричних кислот (кофейну, хлорогенову, неохлорогенову, розмаринову, ферулову).

Вперше з трави та кореневищ з коренями підлісника європейського виділено фракції водорозчинних полісахаридів (ВРПС), пектинових речовин (ПР), геміцелюлози А (ГцА) та геміцелюлози Б (ГцБ). Встановлено їх мономерний склад.

Встановлено основні морфолого-анатомічні діагностичні ознаки сировини, числові показники доброякісності, їх зміни у процесі зберігання. Отримані дані використано для стандартизації сировини.

Вивчено динаміку накопичення БАР в траві, листі, стеблах та кореневищах з коренями досліджуваного об'єкту в залежності від місця зростання. Визначено технологічні параметри сировини та встановлено оптимальні умови одержання екстрактів. Встановлено їх фармакологічну активність.

Вперше проведено ресурсознавчі дослідження підлісника європейського на території Івано-Франківської та Чернівецької областей, визначено запаси сировини. Проведено фенологічні спостереження та агротехнічні дослідження умов культивування рослини в умовах Прикарпаття.

Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 132069 «Спосіб одержання екстракту з трави підлісника європейського з кровоспинною дією» від 11.02.2019 р.

Практичне значення одержаних результатів. Одержано 4 екстракти з сировини підлісника європейського. Встановлено, що екстракти нетоксичні та проявляють кровоспинну, ранозагоювальну, протизапальну та антимікробну активність.

За результатами досліджень розроблено проекти МКЯ «Підлісника європейського трава», «Підлісника європейського трави екстракт сухий».

Незаперечне практичне значення для подальшого забезпечення належної кількості та якості сировини мають розроблені автором з урахуванням рекомендацій Належної практики культивування і заготівлі рослинної сировини (GACP) параметри культивування рослини в умовах Прикарпаття та створена «Інструкція із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

За матеріали дисертаційної роботи видано монографію «Перспективи використання підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.) та астранції великої (*Astrantia major* L.) в медицині та фармації», яку разом з іншими результатами досліджень впроваджено в навчальний процес та наукові дослідження кафедр ВНЗ України, а також в роботу випробувального центру ДП «Івано-Франківськстандартметрологія» та ТОВ «Фітолік, що підтверджено 14 актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Наукові дослідження за темою дисертаційної роботи виконано у співавторстві з науковим керівником – к. фарм. н., доц. Грицик Л. М. Безпосередньо автором здійснено інформаційно-патентний пошук, виділено та ідентифіковано індивідуальні речовини, встановлено кількісний вміст основних груп БАР в траві підлісника європейського, морфолого-анатомічні ознаки сировини, що використано при її стандартизації. Розроблено параметри одержання екстрактів із сировини та проведено їх стандартизацію, досліджено фармакологічну активність та встановлено запаси сировини.

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 в списку публікацій.

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

експериментальних матеріалів, наведених у дисертаційній роботі свідчить, що всі дослідження були проведені на сучасному науковому рівні. Достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів, підтверджується достатньою кількістю дослідів та їх статистичною обробкою. Запропоновані автором наукові положення та висновки, сформульовані в дисертаційній роботі, є достовірними, експериментально обґрунтованими, логічно витікають з отриманих результатів та вирішують поставлені завдання. Загальні висновки відповідають завданням дослідження.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 22 наукові праці, у тому числі 11 статей (із них 6 у фахових наукових виданнях України та 2 у іноземних виданнях), 1 патент України на корисну модель, 1 монографію, 9 тез доповідей. Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на конференціях різного рівня. Опубліковані роботи та автореферат повністю відповідають дисертації та основним положенням, які виносяться на захист.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота викладена на 260 сторінках машинописного тексту (обсяг основного тексту – 186 сторінок) і складається із анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу з описом об'єктів та методів дослідження та трьох розділів із результатами експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та 9 додатків. Дисертація ілюстрована 54 таблицями та 31 рисунком. Список використаних джерел містить 160 найменувань, з яких 121 кирилицею та 39 латиною.

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, визначено предмет та об'єкт дослідження, його мету і завдання, розкрито наукову новизну, підкреслено теоретичне та практичне значення роботи, зазначено особистий внесок дисертантки та дані про апробацію одержаних результатів.

У першому розділі «Підлісник європейський – перспективна лікарська рослина» наведено ботанічну характеристику, дані щодо ареалу, хімічного складу та застосування підлісника європейського в науковій та народній медицині, гомеопатії.

Автор робить обґрунтовані висновки про недостатність вивчення хімічного складу рослини, що створює передумови для проведення ресурсознавчих, фітохімічних та фармакологічних досліджень з метою створення нових лікарських засобів.

У другому розділі «Методи та матеріали дослідження» наведено дані про

об'єкти дослідження, обладнання, матеріали, методи та реактиви, які використовувались для проведення фармакогностичних, технологічних, фармакологічних та ресурсознавчих досліджень. Наведено інформацію про місяця заготівлі сировини підлісника європейського.

Третій розділ «Вивчення складу біологічно активних речовин підлісника європейського» містить результати вивчення складу БАР трави, листків, стебел і кореневищ з коренями *Sanicula europaea* L. У досліджуваній сировині встановлено наявність вільних цукрів, водорозчинних полісахаридів, амінокислот, аскорбінової кислоти, похідних простих фенолів, кумаринів, флавоноїдів, танінів, тритерпенових сапонінів, вітаміну K₁.

У розділі наведено результати виділення та встановлення структури 7 індивідуальних сполук із трави та 5 сполук із кореневищ з коренями підлісника європейського: *n*-кумарової, кофейної, хлорогенової, неохлорогенової, розмаринової і ферулової кислот та рутину.

Методом високоефективної рідинної хроматографії у траві та кореневищах з коренями ідентифіковано та визначено вміст 14 та 13 фенольних сполук відповідно; вміст 17 амінокислот, в тому числі 7 незамінних та 10 замінних.

У траві підлісника європейського хромато-мас-спектрометричним методом ідентифіковано і визначено вміст 3 сполук стероїдної природи; 14 компонентів ефірної олії і 9 жирних кислот. Наведено результати дослідження мінерального складу сировини.

У результаті проведених досліджень із сировини підлісника європейського виділено чотири фракції полісахаридів – водорозчинні полісахариди, пектинові речовини, геміцелюлозу А та геміцелюлозу Б, визначено їх вміст та мономерний склад.

Встановлено, що у сировині підлісника європейського вміст органічних кислот становить від 1,15 % до 1,88 %; аскорбінової кислоти – від 0,018 % до 0,067 %; гідроксикоричних кислот – від 0,55 % до 1,68 %; флавоноїдів – від 0,087 % до 2,72 %; танінів від 1,21 % до 7,91 %; суми поліфенолів – від 2,17 % до 10,95 %; окиснюваних фенолів – від 1,62 % до 4,68%; тритерпенових сапонінів – від 0,33 % до 1,05 %; вітаміну K₁ – від 0,37 % до 1,03 %.

Наведено результати визначення основних груп БАР з різних місць заготівлі сировини.

Четвертий розділ «Виділення комплексів біологічно активних речовин підлісника європейського та дослідження їх фармакологічної активності» присвячено встановленню технологічних параметрів сировини, оптимальних

параметрів екстрагування БАР, розробці технологічних схем та отриманню екстрактів, вивченню їх хімічного складу, безпечності та фармакологічної активності.

У отриманих екстрактах дисертанткою визначено вміст основних груп БАР: водорозчинних полісахаридів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, суми поліфенолів, тритерпенових сапонінів, вітаміну К₁. Проведено дослідження 5 серій кожного екстракту на відповідність розробленим параметрам стандартизації.

Автором встановлено, що екстракти трави підлісника європейського нетоксичні та проявляють кровоспинну, ранозагоювальну, протизапальну та бактеріостатичну активність. Встановлено, що найбільш виражену кровоспинну та ранозагоювальну активність проявляє екстракт підлісника європейського (екстрагент — вода очищена), на який створено проєкт МКЯ «Підлісника європейського трави екстракт сухий».

У п'ятому розділі «Ресурсо-біологічні дослідження та розробка нормативної документації на сировину підлісника європейського» наведено визначені автором основні морфолого-анатомічні ознаки трави та кореневищ з коренями підлісника європейського, природні та антропогенні чинники поширення рослини в Івано-Франківській та Чернівецькій областях, результати визначення запасів сировини. Проведено фенологічні спостереження за розвитком рослини, які використано при встановленні умов культивування *Sanicula europaea* L. Встановлено терміни заготівлі та придатності трави підлісника європейського (2 роки).

У розділі містяться створені автором проєкт МКЯ «Підлісника європейського трава» та «Інструкція із заготівлі та сушіння трави підлісника європейського».

Відмічаючи актуальність, наукову і практичну значимість дисертаційної роботи Легінь Н. І., слід висловити окремі **побажання і зауваження**:

1. На мій погляд, структурні формули відомих сполук, таких як щавлева, яблучна, лимона, олеїнова, лінолева, аскорбінова, розмаринова, хлорогенова кислоти, кверцетин, рутин та інші у дисертації можна не наводити.

2. Посилання на підручники не є коректним, оскільки підручники зазвичай створюються на основі огляду наукових публікацій.

3. Оскільки ви пропонуєте траву підлісника європейського як ЛРС, доцільно було б визначити іще й мікроскопічні ознаки квіток підлісника.

4. Загальновідомі методики кількісного визначення тих чи інших класів БАР не варто наводити у дисертації, достатньо відповідного посилання на літературне джерело.

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

1. Чому при дослідженні протизапальної активності отриманих екстрактів як препарат порівняння Ви обрали «Кверцетин»?

2. В розділах 3.10 і 4.3 представлено результати кількісного визначення основних груп біологічно активних речовин в лікарській рослинній сировині і екстрактах, в тому числі вітаміну K_1 . Виникає питання: наскільки доцільним було б проведення стандартизації екстракту трави підлісника європейського, який проявляє кровоспинну дію, за вмістом вітаміну К?

Проте, наведені зауваження не мають принципового характеру і не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи.

Відповідність дисертації вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів». На підставі викладеного вище вважаю, що дисертаційна робота Легінь Надії Ігорівни на тему «Фармакогностичне дослідження підлісника європейського (*Sanicula europaea* L.)» на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук носить самостійний характер, є завершеним науковим дослідженням, в якому отримано нові науково обґрунтовані теоретичні і практичні результати, що мають певне значення для розвитку фармацевтичної науки і практики в Україні. За своєю актуальністю, новизною, науковим рівнем, обсягом і повнотою досліджень, достовірністю результатів, практичною значимістю дисертаційна робота відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 27.07.2013 р. (зі змінами), а її автор Легінь Надія Ігорівна заслуговує на 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

Підпис професора Ільїної Т. В. засвідчую

Провідний фахівець питань кадрової роботи

відділу кадрів НФаУ



Ильина

Т. В. Ільїна

Купина

О. В. Купіна