

## ВІДГУК

офіційного опонента завідувача кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, доктора фармацевтичних наук, професора Марчишин Світлани Михайлівни на дисертаційну роботу Михайленко Ольги Олександрівни «Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис: перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування», подану до спеціалізованої Вченої ради Д 35.600.02 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Актуальність теми дисертації.** Україна має значний потенціал у сфері фармацевтичного виробництва. Використання вітчизняних лікарських рослин для отримання сировини може сприяти розвитку внутрішнього виробництва та зменшенню залежності від імпортової продукції. Вивчення властивостей вітчизняних лікарських рослин дозволяє ідентифікувати нові біологічно активні сполуки, які можуть бути використані для створення ефективних фітопрепаратів. Проте, варіації клімату, складу ґрунту та техніки вирощування можуть суттєво впливати на хімічний профіль рослинної сировини та екстрактів, тим самим впливаючи на їхні фармакологічні ефекти. В умовах доказової фармації вкрай необхідно проводити комплексні дослідження для з'ясування хімічного складу та фармакологічної дії рослинних препаратів. Це передбачає ретельне експериментування, аналіз даних та інтерпретацію, щоб створити надійну наукову основу для ефективності та безпеки рослинних ліків. Запровадження стандартів вирощування відповідно до рекомендацій Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2012 Лікарські засоби. Належна практика культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження. Посилання, допомагає мінімізувати варіабельність хімічного складу рослинних екстрактів та забезпечити надійні терапевтичні результати. Проводячи дослідження крокусу

посівного та рослин роду Ірис, мета дисертаційного дослідження Михайленко О.О. полягає не лише в дослідженні хімічного складу сировини обраних рослин та оптимізації практики вирощування для підвищення вмісту біологічно активних речовин, але й у розробці нових лікарських субстанцій з цитотоксичним та противірусним потенціалом. Впровадження нових ефективних рослинних ліків для профілактики та лікування низки захворювань, що в кінцевому підсумку покращує результати громадського здоров'я є актуальним завданням сьогодення. Дослідження вітчизняних лікарських рослин, що активно культивуються чи зростають у природі, сприяє збереженню та охороні місцевого біорізноманіття, адже це дозволяє використовувати ресурси без пошкодження екосистем. Враховуючи вищевикладене, вважаю, що представлена дисертаційна робота Михайленко О.О. безперечно має новизну та актуальність.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946). Крім цього, фрагменти дисертаційного дослідження виконані в рамках гранту International Cooperation Add-on Project (MAGIC), 108WFDG310121 (2019–2020).

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Основні положення та висновки дисертаційної роботи Михайленко О. О., обґрунтовані достатньою кількістю якісно проведених експериментальних досліджень, зокрема з використанням хроматографічних методів аналізу сировини та екстрактів, фізико-хімічних методів аналізу структури виділених речовин, сучасних методик оцінки біологічної активності рослинних екстрактів та окремих

речовин. Крім того, автор використовує сучасні методики прогнозування та моделювання фармакологічної дії компонентів, що свідчить про достовірність та ґрунтовність одержаних даних.

Дисертаційна робота має чітко поставлені мету, завдання та висновки результатів дослідження, які логічно взаємопов'язані. Дисертаційна робота Михайленко О.О. є завершеним науковим дослідженням. Вона виконана на високому методичному рівні, має послідовну структуру. Отримані результати, рекомендації та висновки, що наведені у дисертаційній роботі Михайленко О.О., є коректними, науково обґрунтованими та не викликають сумнівів у їх достовірності.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Прорецензована дисертаційна робота Михайленко О.О. охоплює широкий спектр аспектів, починаючи від умов зростання та вирощування рослин до систематичного аналізу хімічного складу та біологічної активності екстрактів крокусу посівного та видів роду Ірис. Це значний внесок у розвиток наукового підґрунтя для виробництва фармацевтичних та фітотерапевтичних препаратів на основі вітчизняної лікарської рослинної сировини. До результатів, які мають елементи наукової новизни, слід віднести:

- здобувачем уперше проведено дослідження, спрямовані на розуміння умов належного вирощування крокусу посівного та видів роду Ірис українського походження, проведено систематичний хімічний аналіз їх сировини. Науково обґрунтовано перспективні джерела рослинних ресурсів з високим вмістом БАР для майбутніх досліджень і створення фітопрепаратів. Усі етапи дослідження та науково-методологічні підходи до контролю якості сировини та екстрактів розроблено автором відповідно до концепції «Якість шляхом розробки», що є, безумовно, новим напрямком у розробці фітопрепаратів.

- важливим компонентом роботи є системна оцінка ризиків виробництва рослинних екстрактів, яка включає в себе аналіз усіх етапів виробництва, починаючи від вирощування рослин і закінчуючи вибором розчинників. Такий

підхід дозволив дисертанту визначити критичні фактори процесу та запропонувати заходи для їх усунення.

- уперше проведено порівняльний аналіз впливу факторів навколишнього середовища на накопичення БАР у сировині крокусу посівного та рослин роду Ірис, вирощених в різних регіонах світу. Це дозволило виявити позитивні закономірності впливу на накопичення речовин-маркерів та рекомендувати оптимальні умови для вирощування даних видів в Україні.

- уперше використано монокомпонентне живлення для впливу на виробництво вторинних метаболітів у рослин роду Ірис. Встановлено позитивний вплив передпосівної обробки бульбоцибулин крокусу посівного на вміст речовин-маркерів.

- уперше розроблено стандартну операційну процедуру одержання стандартних робочих зразків трьох кроцинів та пікрокроцину з шафрану з метою його подальшого контролю якості в аналітичних лабораторіях.

- автором розроблено та вперше наведено умови ВЕРХ методики дослідження профілю апокаротиноїдів, пікрокроцину, шафранлю та фенольних сполук у зразках шафрану, а також у побічних продуктах його виробництва – листках, оцвітині та бульбоцибулинах крокусу посівного. Крім того, вперше розроблено ВЕРХ методику дослідження фенольних сполук у рослинах роду Ірис, яка дозволила провести визначення 25 фенольних сполук. Вперше наведено ГХ-МС методику одночасного дослідження карбонових кислот та амінокислот у рослинній сировині.

- уперше наведено ВЕРХ методику визначення як наявності, так і відсутності колхіцину у рослинній сировині крокусу посівного для вирішення питання про токсичність даної сировини.

- здобувачем розроблено методику ВЕТШХ для контролю якості шафрану та визначення його фальсифікатів. Дана методика використана при розробці умов стандартизації сировини та екстрактів.

- уперше досліджено хімічний склад (фенольні сполуки, карбонові кислоти, амінокислоти, терпеноїди, макро- та мікроелементи) листя, оцвітини, бульбоцибулин крокусу посівного, видів та сортів роду Ірис.

- розроблено нові технології для одержання екстрактів з досліджуваної рослинної сировини, що дозволило вилучити більше вторинних метаболітів, що доведено ВЕРХ методиками.

- уперше модифікованою методикою виділено 16 фенольних сполук з оцвітини українського крокусу та 12 фенольних сполук з кореневищ ірису угорського (крім того, з ірису угорського виділено 18 раніше описаних речовин). Структуру сполук встановлено методами D1 та D2 NMR спектроскопії.

- для всіх рослинних екстрактів уперше проведено дослідження фармакологічної активності: антиоксидантної та експресію NRF2, протигрипозної, протиентеровірусної, протикоронавірусної, протизапальної, протиалергійної, крапельно-ліпідної, цитотоксичної (SK-N-BE(2), U-87, MDA-MB-231, IGR39) та антибактеріальної.

- уперше розроблено власну оригінальну базу даних клінічних противірусних та нейромінідазних препаратів (71 препарат) для включення їх у порівняльний аналіз з 18 фенольними речовинами для прогнозування їх активності.

Наукова новизна дисертаційного дослідження Михайленко О. О. підтверджена 1 патентом на винахід та 3 патентами на корисну модель України. Окрім того, на технологію одержання полісахаридного комплексу з бульбоцибулин крокусу посівного з вираженою цитотоксичною дією на клітини раку меланоми та потрійно-негативного року молочних залоз подано заявку на патент Європейського Союзу LT2021 527, 106245, від 03.06.2021.

**Теоретичне значення результатів дослідження.** Розроблені науково-методичні підходи до контролю якості сировини, а також системна оцінка ризиків виробництва рослинних екстрактів, встановили нові стандарти та методики для подальших досліджень у галузі фітотерапії та фітопрепаратів.

Використання концепції Quality by Design (QbD) у контролі якості дозволяє покращити ефективність виробництва та забезпечити стабільність якості фіто продукції, що є важливим для регулювання стандартів безпеки та ефективності у фармацевтичній промисловості.

Розроблено нові методики для отримання стандартних робочих зразків кроцинів та пікрокроцину та ВЕРХ, ГХ-МС, ВЕТШХ методики аналізу хімічного складу сировини, які відкривають нові можливості для дослідження інших рослинних матеріалів та їх застосування у науковій та практичній фармації.

Дослідження біологічної активності рослинних екстрактів та виявлення їх потенційного використання сприятиме розробці нових лікарських препаратів та природних терапевтичних засобів.

**Практичне значення результатів дослідження.** Проведене комплексне фармакогностичне вивчення сировини крокусу посівного та рослин роду Ірис з урахуванням впливу факторів навколишнього середовища дозволило розробити Стандартні операційні процедури належного вирощування крокусу посівного та рослин роду Ірис, які було імплементовано у роботу фермерських господарств та ботанічних садів в Україні, а також у промислове виробництво Фармацевтичної фабрики Vishpha (Україна) та фермерського господарства «Mts Schipper & Elberse» (Нідерланди).

Розроблено ВЕРХ-методику аналізу фенольних сполук, апокаротиноїдів; експрес-метод для аналізу колхіцину; ГХ-МС-метод аналізу амінокислот та органічних кислот; ВЕТШХ метод визначення фальсифікації шафрану, які опубліковано у високо рейтингових видання за фахом дисертації та впроваджено у роботу науково-практичних лабораторій закладів вищої освіти в Україні.

Здобувачем розроблено проект національної монографії «Шафрану посівного приймочки<sup>N</sup>» ДФУ 2.4 (2020) для контролю якості шафрану.

Розроблено етапи Стандартної операційної процедури одержання робочих зразків пікрокроцину, транс-4GG, транс-2G, транс-3Gg для впровадження у роботу аналітичних лабораторій для контролю якості шафрану.

Використання сучасних фізико-хімічних методів ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-, NOESY, HSQC і HMBC-спектроскопія, тощо) при встановленні структури 46 виділених фенольних речовин дозволило встановити локалізацію замісників та вирішити спірні питання у будові молекул ізофлавонів.

Здобувачем розроблено технологію одержання сухих водних та етанольних екстрактів з шафрану, листя, оцвітини, бульбоцибулин крокусу посівного, а також листя та кореневищ ірису строкатого, ірису угорського, ірису сибірського. Одержано 30 оригінальних рослинних субстанцій, вивчено їх фармакологічну активність. Встановлено значну протигрипозну дію екстракту з кореневищ ірису угорського, протиентеровірусну дію екстракту з кореневищ ірису строкатого, антибактеріальну дію екстракту з листя ірису сибірського, цитотоксичну дію екстракту шафрану до клітин нейробластоми та гліобластоми, антиоксидантну та цитотоксичну дію екстрактів з листя та оцвітини крокусу посівного по відношенню до клітин меланоми та потрійно-негативного раку молочних залоз, виражену цитотоксичну, протигрипозну та протиалергійну дію екстракту з бульбоцибулин крокусу посівного. Для сировини та екстрактів з крокусу посівного розроблено параметри стандартизації.

Використання підходу Herb MaRS для обґрунтування вибору Q-маркерів для сировини та екстрактів на прикладі крокусу посівного та рослин роду Ірис є корисним при плануванні фармакологічних досліджень та вибору маркерів якості для інших рослин.

Використання екологічних методів передпосівної обробки посівного матеріалу крокусу посівного та живлення рослин роду Ірис мають практичне впровадження для досягнення підвищеного та стабільного вмісту БАР у сировині та її врожайності.

Практичне значення також мають результати визначення оптимальних термінів заготівлі сировини ірисів з максимальним накопичення БАР, що слід враховувати при плануванні збору сировини.

Практичні значення результатів дисертаційної роботи підтверджено інформаційним листом про нововведення у галузі охорони здоров'я (№ 376 – 2018), монографією ДФУ та методичними рекомендаціями по вирощуванню крокус посівного в Україні, що впроваджені у роботу фермерських господарств та практичну роботу ДУ “Миколаївська ДСДС” ІКОСГ НААН.

**Повнота викладення матеріалів дослідження.** За матеріалами дисертації опубліковано 78 наукових праць, з яких 36 статей, 5 з яких опубліковано у наукових фахових виданнях України, 1 патенті України на винахід, 3 патенти на корисну модель, 1 інформаційний лист, 1 методична рекомендація, 1 авторське свідоцтво на твір, 31 теза доповідей. 29 статей надруковано у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus та Web of Science.

Дисертанткою опубліковано дві оглядові статті, одна у журналі *Phytochemistry* (Q1) і одна стаття у фаховому виданні України.

Результати дисертаційного дослідження оприлюднювались на конгресах та конференціях України та Європи. Опубліковані матеріали та результати повністю розкривають зміст, досягнення та висновки виконаної дисертаційної роботи.

**Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків**

Дисертаційна робота викладена на 332 сторінках основного тексту та складається із анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, чотирьох розділів власних експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота ілюстрована 70 таблицями та 120 рисунками, 1 схемою. Список використаних джерел містить 520 найменування, з них 53 кирилицею та 467 латиницею.



Робота починається з **анотацій** українською та англійською мовами, у яких стисло представлено результати проведених дисертаційних досліджень. Англійська анотація повністю відповідає анотації українською мовою.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, наведено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, зазначений особистий внесок здобувача, перераховано форуми, де проведена апробація результатів роботи, наведено кількість публікацій за матеріалами дисертації, її об'єм і структуру.

У *першому розділі (огляд літератури)* наведено дані огляду літератури про хімічний склад, біологічну активність та питання біосинтезу маркерних сполук у рослинах роду Крокус та Ірис. Окрім того, описано сучасний стан законодавчої бази країн ЄС та України про виробництво ЛРЗ та запровадження рекомендації ВООЗ GACP, що дозволило окреслити актуальний напрям дисертаційного дослідження.

*Другий розділ* описує дизайн дослідження, обрані об'єкти дослідження, методи аналізів та методики (хроматографічні та фармакологічні), обрані підходи до обґрунтування вибору маркерних сполук у сировині та рослинних екстрактах; наведено умови вдосконалення методів одержання сухих рослинних екстрактів, а також умови виділення та встановлення будови індивідуальних речовин з ЛРС. Здобувачем у дослідження включено 10 видів та сортів рослин роду Крокус, з них перевагу у подальшому аналізі надано крокусу посівному, а також 38 видам та 34 сортам рослин роду Ірис.

*Третій розділ* присвячено порівняльному дослідженню приймочок крокусу посівного, вирощеному в Україні та 12 країнах світу. Досліджено склад апокаротиноїдів, фенольних сполук, карбонових кислот, амінокислот. Розроблено стандартну операційну процедуру одержання робочих зразків трьох кроцинів та пікрокроцину для контролю якості сировини. Імплементовано методику ВЕТШХ для стандартизації сировини та визначення фальсифікатів. Запропоновано методику ВЕРХ для визначення відсутності колхіцину у ЛРС. Встановлено якість зразків шафрану у відповідності до ISO3632, яку пропонує

харчова промисловість. За результати проведених досліджень розроблено монографію монографії «*Шафрану посівного приймочки* <sup>N</sup>» та введено її до національної частини ДФУ.

У розділі також наведено результати фармакологічного скринінгу сухих екстрактів з шафрану: визначення цитотоксичної, антибактеріальної, антиоксидантної, протизапальної, протиалергійної, протівірусної дії. За результатами досліджень запропоновано маркери якості сировини та екстрактів.

**Четвертий розділ** присвячений дослідженню хімічного складу та фармакологічної активності сухих екстрактів із побічних продуктів виробництва шафрану – листя, оцвітини та бульбоцибулин (сировини, одержаної з різних регіонів України), у якій встановлено якісний склад та визначено кількісний вміст фенольних сполук, амінокислот, карбонових кислот, макро- та мікроелементів. Розроблено параметри стандартизації сировини та екстрактів. Проведено виділення індивідуальних речовин з оцвітини крокусу посівного та встановлено їх будову. Досліджено антиоксидантну та експресію NRF2, протівірусну, протизапальну, протиалергійну, крапельно-ліпідну, цитотоксичну (SK-N-BE(2), U-87, MDA-MB-231, IGR39) та антибактеріальну активності одержаних рослинних екстрактів. Наведено результати протизапальної активності екстрактів-лідерів *in vivo*. З використання підходу HerbMars автором обґрунтовано вибір маркерів якості.

У **п'ятому розділі** наведено результати порівняльного аналізу складу фенольних сполук та оцінка впливу факторів навколишнього середовища на їх накопичення у сировині рослин роду Ірис. Окрім того, наведено модифіковану методику виділення індивідуальних речовин із кореневищ ірису угорського та застосування сучасних фізико-хімічних методів для визначення будови цих речовин. Автором виділено та описано 12 нових фенольних сполук з ірису та 18 раніше описаних.

У розділі наведено дані застосування ChemGPS-NP методу для обґрунтування вибору перспективних противірусних речовин для подальших досліджень *in vitro*. У розділі наведено результати визначення цитотоксичної, противірусної, протиалергічної, нейрамінідазної, антибактеріальної, антиоксидантної, протизапальної, крапельно-ліпідної активності екстрактів листя та кореневищ ірису строкатого, ірису угорського, ірису сибірського. Автором обґрунтовано вибір речовин-маркерів для сировини, екстрактів та умов вирощування рослин.

У *шостому розділі* автором розроблено етапи належного вирощування крокусу посівного, ірису угорського, *I. x hybrida hort. 'Indian Pow Wow'*, *I. x hybrida hort. 'Galleon Gold'* з дотриманням принципів Належної практики культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження з урахуванням ґрунтово-кліматичних умов різних регіонів України.

Після кожного розділу дисертації автором наведено ґрунтовні висновки, у кінці – загальні висновки, які відповідають основним результатам проведених досліджень та повністю розкривають мету та поставлені завдання дисертаційного дослідження і логічно витікають з них.

Реферат роботи як за структурою, так і за змістом відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

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

1. У роботі наведено рисунки (1.8, 1.13, 1.14, 1.15, 3.2, тощо), які містять надписи англійською мовою, які було б доречно перекласти на українську мову для досягнення однотипності ілюстрації матеріалу.

2. Результати кількісного вмісту речовин наведено у різних одиницях виміру – в одному випадку у мг/г, а в іншому мкг/г.

3. По тексту слід використовувати аббревіатури, що наведено на початку дисертації, а саме БАР, ЛРЗ, тощо для оптимізації тексту.

4. Було б доречним продовжити дослідження монокомпонентного живлення ірисів для отримання вибірки даних за декілька років, та, крім того,

проведення оцінки фармакологічного потенціалу сировини після застосування живлення.

5. Доречно було б навести більш детальний склад полісахаридного комплексу бульбоцибулин крокусу посівного, враховуючи його виражену цитотоксичну дію.

6. У дисертації наявні поодинокі технічні помилки, по тексту роботи зустрічаються невдалі стилістичні 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 дисертантка відповіла на такі запитання:

1. Обґрунтуйте, будь ласка, вибір фармакологічних ефектів одержаних Вами екстрактів.
2. З якою метою Ви наводите в роботі схеми біосинтезу ізофлавоноїдів?

#### **Рекомендації щодо використання результатів дослідження.**

Запропоновані дисертантом методики кількісного визначення фенольних сполук, карбонових кислот, амінокислот, колхіцину мають значну перспективу для дослідження інших рослин, а використаний підхід «Якість шляхом розробки» при плануванні та проведенні досліджень лікарських рослин має сприяти надійності та якості результатів на кожному етапі досліджень. Запропонована Стандартна операційна процедура одержання робочих стандартів кроцинів та пікрокроцину є корисною для фахівців лабораторій контролю якості. Розробка та впровадження етапів належного вирощування лікарських рослин з урахуванням етапів Належної практики культивування та збирання вихідної сировини рослинного походження сприятиме більшому розвитку лікарського рослинництва в Україні та поширенню імпорту якісної вітчизняної рослинної сировини. Доцільним є введення методик та підходів аналізу рослинної сировини у науковий та навчальний процес для студентів фармацевтичного факультету.

**Висновок про відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам пункту 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук».**

Розглянувши дисертацію Михайленко Ольги Олександрівни на тему «Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис: перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування» та наукові праці, в яких висвітлені основні результати експериментальних досліджень, вважаю, що робота є актуальним і закінченим науковим дослідженням, у якому одержано нові науково обґрунтовані результати. Дисертаційна робота виконана з використанням сучасних методів аналізу, має наукову та практичну значимість; у ній відсутні порушення академічної доброчесності.

Таким чином, дисертаційна робота Михайленко Ольги Олександрівни на тему «Фармакогностичне дослідження крокусу посівного та рослин роду Ірис: перспективи комплексного використання та оптимізація вирощування» відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., а її автор, Михайленко Ольга Олександрівна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора 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



Світлана МАРЧИШИН



...ситий підпис

...завіряю

...ник ректора з кадрових питань  
...нопільського національного  
...ніверситету

