

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора фармацевтичних наук, професора, завідувача кафедри технологій фармацевтичних препаратів Національного фармацевтичного університету

КУХТЕНКА ОЛЕКСАНДРА СЕРГІЙОВИЧА

на дисертаційну роботу аспірантки кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

Національного університету «Львівська Політехніка»

КАРПЮК ВІКТОРІЙ РУСЛАНІВНИ

«Фармакогностичне дослідження рослин родини *Ranunculaceae* та розробка субстанцій різної спрямованості дії на їх основі», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 – фармація, промислова фармація у галузі знань 22 – охорона здоров'я

Актуальність теми дисертаційної роботи

Використання рослинної сировини для створення лікарських засобів є актуальною та досить важливою темою в сучасній медицині та фармації. Тисячоліттями людство використовувало рослини для покращення здоров'я та лікування різноманітних захворювань. І сьогодні, незважаючи на значний прогрес у сфері синтезу та хімічної фармакології, рослинна сировина залишається одним із основних джерел компонентів для лікарських засобів.

Менша схильність до спричинення небажаних побічних ефектів та алергічних реакцій порівняно зі синтетичними аналогами; більш глибокий та збалансований вплив на організм; м'який вплив на організм людини порівняно із синтетичними лікарськими засобами; мінімальна взаємодія з іншими препаратами та можливість лікувати поліморбідні патології – все це спонукає вчених продовжувати пошук ефективних засобів на основі лікарської рослинної сировини.

Актуальним завданням для фармацевтичної науки, зважаючи на збільшення попиту в останні роки на засоби на основі лікарської рослинної сировини, є пошук нових видів рослин, які могли б стати джерелом біологічно активних сполук, а саме: кумаринів, сапонінів, ефірних олій, амінокислот, алкалоїдів, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот та ін.

Лікарські рослини, які належать до родини *Ranunculaceae* (Жовтецеві), є перспективними об'єктами для наукових досліджень. Це пояснюється тим, що

ці рослини містять комплекс біологічно активних речовин (алкалоїди, сапоніни, кардіостероїди, фенольні сполуки та інші), які можуть володіти різноманітною терапевтичною активністю. Наявність значного комплексу активних компонентів дозволяє використовувати ці рослини в медичній практиці, зокрема, для створення традиційних лікарських засобів. В той же час, хімічний склад представників родини *Ranunculaceae* залишається недостатньо дослідженим.

Дослідження окремих представників родини *Ranunculaceae*, а саме *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds., *Ranunculus acris* L., з метою розробки лікарських засобів різної спрямованості дії, є перспективним напрямком фармацевтичної науки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська Політехніка» – «Біотехнологічні та фітохімічні аспекти дослідження процесу одержання біологічно активних сполук з лікарських рослин» (номер державної реєстрації 0119U101965).

Структура та зміст дисертації

Дисертаційна робота викладена на 234 сторінках, із яких 146 сторінок основного тексту, складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота ілюстрована 51 таблицею і 50 рисунками. Список використаних джерел містить 182 найменування, з них 88 кирилицею і 94 латиною.

Вступ має типову структуру: обґрунтовано вибір теми дослідження, розкрито зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами науково-дослідних робіт університету, представлено мету і завдання дослідження, наведено предмет, об'єкт і методи дослідження, зазначено наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення, визначено особистий внесок здобувача, представлено апробацію результатів дисертації, наведено структуру та обсяг роботи.

В *першому розділі* дисертаційної роботи представлено інформаційну та теоретичну основу досліджень. В розділі представлено аналіз сучасного стану дослідження рослин родини *Ranunculaceae* в Україні та світі. Дисертантом проведені маркетингові дослідження фармацевтичного ринку лікарських засобів на основі лікарської рослинної сировини рослин родини *Ranunculaceae*; та перспективи їх фармакогностичних і фармакологічних досліджень, проведений аналіз даних літератури щодо характеристики, поширення, вмісту біологічно активних речовин, фармакологічних властивостей визначеного переліку потенційних неофіціальних видів рослин родини *Ranunculaceae* – *Caltha palustris* L. (калюжниця болотна), *Ficaria verna* Huds. (пшінка весняна) та *Ranunculus acris* L. (жовтець їдкий).

З урахуванням підходів до фармацевтичної розробки нових лікарських засобів на основі рослин родини *Ranunculaceae* у розділі було проаналізовано аспекти розробки нових лікарських засобів на основі рідких екстрактів.

У *другому розділі* «Обґрунтування загальної концепції та методів дослідження», представлено методологію досліджень, яка складається із інформаційно-пошукового аналізу, етапу обрання об'єктів дослідження та їх характеристики, підходів до розробки рідких екстрактів і розробки складу та технології отримання складного екстракту.

У розділі наведено характеристику і умови заготівлі рослин родини *Ranunculaceae* (трава *Caltha palustris* L., трава *Ficaria verna* Huds., трава *Ranunculus acris* L.) та основні параметри отриманих простих та складних екстрактів досліджуваної рослинної сировини.

Представлено методики фармако-технологічних, фізико-хімічних, фармакологічних, статистичних досліджень, що використовувались для досягнення мети та завдань роботи.

У *третьому розділі* наведено результати досліджень, направлених на розробку технології та вибору умов екстракції для отримання рослинних екстрактів рослин родини *Ranunculaceae*.

Встановлено оптимальні умови отримання рідких екстрактів *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds. та *Ranunculus acris* L. методом мацерації із максимальним вмістом БАР. Визначено ефективний екстрагент – 70 % водно-етанольний розчин, при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10. Екстракцію проводили при температурі 18-20°C протягом 72 год для трави *Caltha palustris* L. (розмір частинок 0,5-1 мм) та трави *Ranunculus acris* L. (розмір частинок 1,5-3 мм) та 48 год для трави *Ficaria verna* Huds. (розмір частинок 0,5-2 мм).

Автором розроблено проєкти МКЯ на отримані екстракти трави *Caltha palustris* L., трави *Ranunculus acris* L. та трави *Ficaria verna* Huds.; проведено стандартизацію рідких екстрактів за вмістом сухого залишку та флавоноїдів.

Якісний фітохімічний аналіз та кількісне визначення вмісту біологічно активних речовин у *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds. та *Ranunculus acris* L. було проаналізовано **в четвертому розділі** дисертаційної роботи.

Було встановлено наявність та досліджено кількісний вміст фенольних сполук, флавоноїдів, дубильних речовин, алкалоїдів, кумаринів та сапонінів. Із використанням методів тонкошарової хроматографії ідентифіковано фенольні речовини в досліджуваних рослинах (хлорогенову кислоту, лютеолін, кавову, ферулову кислоту, кверцетин та хризин). Методом ВЕРХ ідентифіковано та встановлено кількісний вміст 8 сполук фенольного характеру у рідкому екстракті трави *Ficaria verna* Huds. (найвищий вміст становила кавова кислота (2,49%), п-кумарова (1,35%) та хлорогенова кислота (0,92%)). У екстракті трави *Caltha palustris* L. було встановлено кількісний вміст 6 сполук, серед яких найбільший вміст мала кавова (2,05%) та хлорогенова кислота (0,82%). При дослідженні екстракту трави *Ranunculus acris* L. було визначено кількісний вміст 6 сполук, які присутні в незначній кількості. Дисертантом за допомогою спектрофотометричних досліджень визначено кількісний вміст суми фенольних сполук у досліджуваних екстрактах. Найвищий вміст фенольних сполук міститься у екстрактах отриманих за допомогою 70 % водно-етанольного розчину. Для екстракту *Caltha palustris* L. вміст фенолів становить $50,51 \pm 0,11$ мг/г, для екстракту *Ficaria verna* Huds. – $20,35 \pm 0,12$ мг/г та у 70% та

екстракту *Ranunculus acris* L. – $18,69 \pm 0,08$ мг/г.

Було визначено кількісний вміст дубильних речовин у траві *Caltha palustris* L., *Ranunculus acris* L. та *Ficaria verna* Huds. перманганатометричним, комплексонометричним та спектрофотометричним методами. Результати дослідження показали, що трава *Caltha palustris* L. містить 6-16 % дубильних речовин у складі, трава *Ficaria verna* Huds. – 0,1-6 %, трава *Ranunculus acris* L. – 2-9 %. Було встановлено якісний і визначено кількісний вміст алкалоїдів у досліджуваній сировині. Вміст алкалоїдів у траві *Ficaria verna* Huds. становив 4,25 % в перерахунку на суху 115 речовину, у траві *Ranunculus acris* L. – 0,1 % на суху речовину та у траві *Caltha palustris* L. – 3,84 % на суху речовину. Спектрофотометричним методом визначено кількісний вміст кумаринів. Для трави *Caltha palustri* L. він становить 0,47 % на суху речовину, трави *Ficaria verna* Huds. – 0,045 % на суху речовину та трави *Ranunculus acris* L. – 0,028 % на суху речовину. Вивчено склад хлороформних фракцій досліджуваних рослин. Згідно з аналізом отриманих хроматограм експериментальних зразків екстрактів виявлено і встановлено кількісний вміст 26 летких сполук у екстракті трави *Caltha palustris* L., 28 летких сполук у екстракті трави *Ficaria verna* Huds. та 33 летких сполук у екстракті трави *Ranunculus acris* L. серед яких: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани) тощо

П'ятий розділ «Розробка складу складного екстракту на основі рослин родини *Ranunculaceae*» містить експериментальні дані щодо підходів до розробки складного екстракту на основі рослин родини *Ranunculaceae*. В розділі теоретично та експериментально обґрунтовано склад і технологію отримання складного екстракту на основі трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds. та трави *Ranunculus acris* L. двома методами: отримання екстракту з композиції рослинної сировини та отримання екстракту шляхом змішування індивідуальних екстрактів з окремо взятої рослинної сировини. Досліджено вміст екстрактивних речовин у отриманих складних екстрактах та проведено визначення кількісного вмісту фенольних сполук та флавоноїдів. Встановлено,

що кількісний вміст фенольних сполук та флавоноїдів вищий у складних екстрактах отриманих методом з композиції індивідуальних екстрактів з окремо взятої рослинної сировини *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds. та *Ranunculus acris* L. зі співвідношенням екстрактів 2:2:1.

На основі проведених досліджень розроблено проєкт МКЯ «Складний екстракт трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds. та трави *Ranunculus acris* L.»

В шостому розділі було проведено дослідження біологічної активності, фармакологічної дії та використання екстрактів *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds. та *Ranunculus acris* L.

Вивчено гостру токсичність досліджуваних екстрактів та встановлено, що екстракти з трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds., трави *Ranunculus acris* L. і складний екстракт у максимальному дозуванні відносяться до IV класу токсичності, $LD_{50} > 6000$ мг/кг (не токсичні для живих організмів). Методом дифузії в агар та методом серійних розведень було визначено, що досліджувані екстракти проявляють антимікробну активність щодо грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. 70% екстракти *Ficaria verna* Huds., *Ranunculus acris* L. проявили активність відносно клінічного штаму стафілококів. Встановлено, що більшість досліджуваних 90 % та 70 % екстрактів ЛРС та складний екстракт у розведенні 1:1 володіють бактерицидною дією. Найвищі протигрибкові показники щодо грибів *Candida albicans* проявляють екстракт трави *Caltha palustris* L., трави *Ranunculus acris* L. та складний екстракт.

Найвищий ступінь інактивації ДФПГ (за методикою інактивації радикалу ДПФГ) проявляють 70 та 90 % екстракти трави *Caltha palustris* L., 70 % екстракт трави *Ficaria verna* Huds., 70 % екстракт трави *Ranunculus acris* L. та складний екстракт. Найвищу активність, щодо знебарвлення катіон-радикала АБТС проявили 70% екстракт трави *Caltha palustris* L., екстракти з трави *Ficaria verna* Huds. та складний екстракт. Було вперше проведено дослідження показників оксидативного стресу на тваринних тканинах. Оцінку активності екстрактів

проведено з урахуванням бактерицидної дії етанолу. Досліджувані екстракти та складний екстракт за двома показниками оксидативного стресу проявили високі антиоксидантні властивості на гепатоцитах печінки щура в умовах ініціювання вільно-радикального окиснення *in vitro*.

Всі досліджувані екстракти показали відносно невисокий рівень протизапальної активності відносно референс-препаратів. Найкращий рівень протизапальної активності продемонстрував складний екстракт, показник пригнічення запальної реакції, якого становив 10,6%. Вивчення гепатопротекторних властивостей екстрактів трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds., трави *Ranunculus acris* L. та складного екстракту проводили на моделі гострого тетрахлорметан-індукованого токсичного гепатиту. Екстракти трав та складного екстракту виявляли помірні гепатопротекторні властивості та сприяли частковій нормалізації функції печінки. Досліджувані екстракти можуть бути ефективними, як профілактичний лікарський засіб для тривалого застосування при токсичних ураженнях.

Було досліджено потенційну можливість застосовувати екстракти у синтезі наночастинок срібла прямою взаємодією нітрату срібла з досліджуваними екстрактами рослин у водному розчині без застосування додаткових синтетичних та токсичних матеріалів. Одержані наночастинок досліджено методом УФ-спектроскопії.

Розроблено проекти МКЯ на мoneоекстракти трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds., трави *Ranunculus acris* L. та на складний екстракт отриманий за рахунок композиції наведених рослин родини *Ranunculaceae*.

Висновки по дисертаційній роботі відображають досягнення поставленої мети та вирішення завдань, містять результати науково-практичних досліджень, обґрунтувань та рекомендацій.

Загалом, оцінюючи в цілому зміст дисертаційної роботи Карпюк Вікторії Русланівни, варто зазначити, що робота представлена логічно, з належним науково-прикладним обґрунтуванням кожного етапу дослідження. Надані

розробки та результати мають необхідні пояснення й не викликають сумніву в їх обґрунтованості та достовірності.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і
рекомендацій, що сформульовані у дисертаційній роботі та їх
достовірність**

Наукові положення, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, ґрунтуються на використанні достатнього інформаційного, дослідницького та експериментального матеріалу. Дисертаційні дослідження виконані на належному науковому рівні з застосуванням сучасних методів та статистичної обробки даних.

Достовірність отриманих результатів та висновків дисертаційної роботи засвідчується сучасними статистичними методами, проведеними з використанням програмного забезпечення.

Новизна дослідження та одержаних результатів

Дисертантом вперше проведено фітохімічний аналіз рослин родини *Ranunculaceae* - *Caltha palustris* L., *Ficaria verna* Huds. та *Ranunculus acris* L. флори України. Автором ідентифіковано та визначено кількісний вміст фенольних сполук, флавоноїдів, алкалоїдів, дубильних речовин, сапонінів та кумаринів у траві *Caltha palustris* L., траві *Ficaria verna* Huds. та траві *Ranunculus acris* L. Вперше вивчено склад хлороформних фракцій досліджуваних рослин. Виявлено і встановлено кількісний вміст 26 летких сполук у екстракті трави *Caltha palustris* L., 28 летких сполук у екстракті трави *Ficaria verna* Huds. та 33 леткі сполуки у екстракті трави *Ranunculus acris* L. серед яких: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани) тощо. Вперше запропоновано методику отримання та розроблено склад складного екстракту з трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds. та трави *Ranunculus acris* L. Досліджено гостру токсичність екстрактів, вивчено антимікробну та фунгіцидну активність екстрактів, встановлено антиоксидантну,

протизапальну, гепатопротекторну дії. Вперше проведено дослідження показників оксидативного стресу на тваринних тканинах.

Теоретичне значення отриманих результатів

Результати представленої дисертаційної роботи надають нові уявлення щодо сучасних підходів до фармацевтичної розробки моно- та складних екстрактів рослин родини *Ranunculaceae* на підставі проведення комплексних фармакотехнологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних та біологічних досліджень.

Практичне значення отриманих результатів.

Дисертаційна робота є фундаментальним дослідженням. Дисертантом розроблено спосіб отримання екстракту з трави *Caltha palustris* з антиоксидантною дією (підтверджено та захищено патентом України на корисну модель №149454 «Спосіб одержання екстракту з трави *Caltha palustris* з антиоксидантною активністю»). Розроблено проєкти МКЯ на отримані екстракти з трави *Caltha palustris* L., трави *Ficaria verna* Huds., трави *Ranunculus acris* L. та складного екстракту. Результати дослідження хімічного складу, ботанічної характеристики, ареалу поширення впроваджено в наукову роботу та навчальний процес при підготовці фахівців фармацевтичного профілю у закладах вищої освіти України.

Отримано свідоцтво на реєстрацію авторського права на твір наукова стаття «Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity of *Ficaria verna*» (№114614).

Повнота викладу в опублікованих працях.

Результати дисертаційного дослідження опубліковано в 24 наукових працях з яких 1 стаття у виданнях, що включені до наукометричних баз Scopus та Web of Science, 6 статей у фахових наукових виданнях України, 2 статті є опубліковані у наукових періодичних виданнях іншої держави, 1 розділ колективної монографії та 1 патент на корисну модель. Апробацію наукових результатів було проведено на 14 вітчизняних та міжнародних науково-

практичних конференціях. Публікації відображають основний зміст роботи. Результати роботи широко апробовані на різного рівня наукових заходах.

Недоліки дисертації щодо її змісту і оформлення

У цілому дисертаційна робота виконана та оформлена належним чином. Однак варто висловити деякі **зауваження і побажання**:

1. Наприкінці 1 розділу на рис. 1.11 «Алгоритм розробки складу і технології ЛЗ на основі ЛРС» не повною мірою представлені параметри, що впливають на якісні та кількісні показники отриманого рідкого екстракту. Також слід зазначити, що дана схема підходить до технології лікарського засобу ЛЗ «рідкий екстракт» і не може бути застосована до ЛЗ, що отримують на основі рідкого екстракта.

2. Ряд методик досліджень, що наведені в 4 розділі (фізико-хімічні) та в розділі 6 (фармакологічні) більш доречно було навести в 2 розділі дисертаційної роботи.

3. Проведена статистична обробка отриманих результатів досліджень в табл. 4.12, 5.7, 6.6, 6.7 потребує уточнення.

4. Автором роботи не коректно було запропоновано одне із завдань роботи – «розробка складу субстанції різної спрямованості дії». В роботі проводиться розробка складного екстракту на основі лікарської рослинної сировини, що досліджувалась.

5. Виникає питання, чи проводився аналіз розміру наночасток отриманих за рахунок «зеленого синтезу»?

6. У роботі зустрічаються неточності і граматичні помилки.

Однак, представлені зауваження не впливають на загальну високу оцінку роботи і не зменшують її наукової та практичної цінності.

Висновок

На підставі наукової новизни роботи, її значної практичної значимості для фармацевтичної галузі, з урахуванням оригінальних наукових публікацій вважаю, що представлена дисертаційна робота Карпюк Вікторії Русланівни на тему «Фармакогностичне дослідження рослин родини *Ranunculaceae* та розробка субстанцій різної спрямованості дії на їх основі» на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 226 – «Фармація, промислова фармація» є завершеною науковою працею, що повністю відповідає вимогам Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та постанові Кабінету міністрів України № 44 «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» зі змінами внесеними згідно Постанови КМ №341 від 21.03.2022 р., а її автор Карпюк В.Р. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Офіційний опонент,
завідувач кафедри технологій
фармацевтичних препаратів
Національного фармацевтичного
університету, доктор
фармацевтичних наук, професор



Олександр КУХТЕНКО

Підпис д. фарм. н. професора Олександра КУХТЕНКО засвідчую:

Провідний фахівець відділу кадрів фау

Віра ДВЕРНИЦЬКА

