

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Коврегін Олексій Володимирович

УДК: 582.688.3:615.281.8:615.451.1:615.07

ДИСЕРТАЦІЯ

**«Фармакогностичне вивчення трави та екстрактів зимолюбки зонтичної
(*Chimaphilla umbellata* L.) для створення фітозасобів»**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 О.В. Коврегін

Науковий керівник Владимирова Інна Миколаївна,
доктор фармацевтичних наук, професор

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Коврегін О.В. Фармакогностичне вивчення трави та екстрактів зимолюбки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* L.) для створення фітозасобів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2025.

У дисертаційній роботі представлене фармакогностичне дослідження трави зимолюбки зонтичної, одержанню фітозасобів, стандартизації сировини та одержаних рослинних засобів.

У *першому* розділі дисертаційної роботи проаналізовано відомості наукової літератури щодо ботанічної характеристики, хімічного складу та фармакологічних властивостей зимолюбки зонтичної. Встановлено, що зимолюбка зонтична (*Chimaphilla umbellata* (L.)) – багаторічна трав'яниста рослина, що має сечогінну, в'язучу, болезаспокійливу та інші дії; і може бути застосована для профілактики та лікування при захворюваннях нирок та сечовивідних шляхів. У траві зимолюбки зонтичної виявлені глікозид арбутин, дубильні речовини (до 5 %), флавоноїди, таніни, гірку речовину (урсон), органічні кислоти, камеді, смоли, слиз. Також у траві містяться ситостерин, хінна і галова кислоти, метиловий ефір саліцилової кислоти, вітаміни, мікроелементи та інші біологічно активні речовини. Досліджено, що засоби рослинного походження позитивно діють при хворобах нирок і сечових органів.

На сьогодні не проводилось фармакогностичне дослідження трави зимолюбки зонтичної, що зростає в Україні, а також відсутні нормативні показники параметрів стандартизації сировини зимолюбки зонтичної, що обумовлює актуальність обраної теми.

У *другому* розділі представлено характеристику об'єкту дослідження, відомості щодо методів, реактивів і методик, за якими здійснювалось вивчення якісного складу та визначення кількісного вмісту біологічно активних речовин у траві зимолюбки зонтичної, дослідження рослинних субстанцій отриманих таблеток. Також наведені методики фармакологічних досліджень з визначення властивостей сировини та отриманого екстракту.

Третій розділ містить результати фітохімічного дослідження вивчення трави зимолюбки зонтичної. Сучасним методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) досліджено фенольні сполуки трави зимолюбки зонтичної. У результаті аналізу хроматографічних профілей, отриманих зі зразків сировини, ідентифікували зони на рівні гіперозиду, авікулярину та ізокверцетину у порівнянні із зонами стандартних зразків. Порівняння зон у траві зимолюбки із зонами стандартів, підтвердило наявність гіперозиду (R_f 0.41), авікулярину (R_f 0.67), ізокверцетину (R_f 0.45), галової (R_f 0.81), кофейної кислот (R_f 0.87) у досліджуваній сировині.

Методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) кількісно визначено 8 фенольних сполук – апігенін, гіперозид, кверцитрин, рутин, кверцетин, галова кислота, гуаяверин та ізокверцетин. Для оцінки антиоксидантного потенціалу окремих фенольних сполук *in vitro* у траві зимолюбки, було використано метод ВЕРХ/ABTS з постколонковою дериватизацією. За результатами попередньої оцінки антиоксидантного вкладу окремих фенольних сполук у загальну ефективність екстракту трави зимолюбки визначений суттєвий ефект похідних кавової кислоти та кверцетину.

Кількісне визначення амінокислот проводили методом ГХ-МС. За результатами дослідження встановлений вміст амінокислот (мкг/г) у такій послідовності за зменшенням: L-глутамінова кислота (14.47)>L-аланін (4.03)>L-аспарагінова кислота (3.31)> L-валін (0.26)> L-пролін (0.17)> ізолейцин (0.13)> L -лейцин (0.05).

Методом ГХ-МС у траві зимолюбки зонтичної ідентифіковано та кількісно визначено 21 речовину, що переганяється з водяною парою. Були визначені спирти (гексанол-3, октанол-3), альдегіди, ацеталі і кетони (гексаналь, октанон-3, гексагідрофарнезилацетон), терпеноїди (β -бурбонен, β -елемен, α -селінен, γ -кадінен, каламенен, дигідроактинідіолід, спатуленол, каріофіленоксид), алкани (тетрадекан), похідні ароматичних карбонових кислот (фталат), фенольні сполуки – флавон, алкани (гептакозан, нонакозан), алкадієни (1,21-докозадієн), фітостерини (γ -ситостерол).

Уперше проведені комплексні мікроскопічні дослідження та встановлені діагностичні ознаки трави зимолюбки зонтичної:

Листок *Chimaphilla umbellata* дорзовентральний, гіпостоматичний. На поверхні, як адаксіальної, так і абаксіальної епідерми виражено залягають шари кутину.

Нижня епідерма представлена звивистостінними клітинами, що мають товсті оболонки з простими прямими порами. В ній досить щільно розташовуються актиноцитні продихові апарати.

Клітини верхньої епідерми мають більш правильну видовжено-прямокутну форму з незначними звивистими вигинами. Клітинні стінки потовщені з простими прямими порами. Біля жилок концентруються скупчення кристалів оксалату кальцію – друзи.

Стебло вкрите перидермою з неоднорідним верхнім рядом клітин, залишків епідерми, зовнішній поверхня якої має добре розвинений кутикулярний шар, типовий для ксерофільних рослин, з бородавчастими, сосочкоподібними трихомами.

Для підтвердження наявності певних біологічно активних речовин проведено ряд гістохімічних реакцій: реакцією з Суданом III дала позитивний результат на речовини ліпідної природи; з FeCl_3 визначили наявність дубильних речовин; реакцією з розведеною нітратною кислотою визначили арбутин в епідермі, поперечному перерізі стебла і листка; для встановлення клітин з лігніфікованими оболонками було використано флороглюцин з

концентрованою хлористоводневою кислотою під дією яких здерев'янілі оболонки набули яскраво-малинового забарвлення.

Досліджено вміст макро- та мікроелементів у траві зимолубки зонтичної методом атомно-емісійної спектрографії. Серед елементів з найбільшим вмістом (мкг/100г) слід відзначити натрій (862,00), калій (1368,00), сіліцій (420,00), магній (231,00), фосфор (125,00); серед мікроелементів: кальцій (530,00), манган (18,00), ферум (9,00).

У четвертому розділі наведено визначення показників якості трави зимолубки зонтичної: втрата в масі при висушуванні ($7,15 \pm 0,11$ %), загальна зола ($2,90 \pm 0,10$ %), зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті ($1,10 \pm 0,12$ %), вміст сторонніх домішок ($3,89 \pm 0,18$ %) та технологічні параметри сировини: ступінь подрібнення сировини; питома поверхня часток сировини; поглинання сировиною екстрагента; питома, об'ємна та насипна маси, пористість і нарізність, вільний об'єм шару сировини. Оптимальним екстрагентом визначено 50 % етанол.

З трави зимолубки зонтичної отримано екстракт рідкий та запропоновано параметри його стандартизації: опис, розчинність, ідентифікація флавоноїдів кислот методом ТШХ, вміст важких металів, вміст сухого залишку, вміст етанолу, мікробіологічна чистота, кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (становив не менше 1,5 %).

Для отриманого рідкого екстракту з трави зимолубки зонтичної досліджені фармакологічні властивості.

Дослідження впливу екстракту трави зимолубки на клітинні культури лінії L929 (фібробласти жирової тканини миші) проводили на базі Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. Клітини культивували у середовищі DMEM (Bio West, Франція) збагаченому 10 % FBS (Lonza, Німеччина) з 1 % антибіотику-антимікотику (Bio West, Франція), у CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері з 5 % CO₂. Визначення мінімальної токсичної концентрації оцінювали за морфологічними ознаками клітин і встановили, що екстракт зимолубки мав

токсичний вплив на клітини L929 при додаванні до середовища культивування в концентрації вище 0,01 %. При цьому токсичний вплив мав пороговий ефект. Найбільш чутливими виявились міграційна та проліферативна функції клітини, менш чутливими – енергетична, піноцитозна та збереження морфологічної цілісності клітин. За отриманими результатами, запропоновано для подальшого дослідження застосовувати концентрації 0,05; 0,02, 0,01; 0,005 % екстракту зимолюбки.

Визначення антиоксидантної дії та дослідження нефропротекторного впливу проводили на моделі хромат-індукованої ниркової недостатності (хронічної хвороби нирок) у щурів на базі навчально-наукової тренінгової лабораторії медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету. Застосування екстракту зимолюбки у експериментальних тварин відзначалося нормалізацією діурезу, зменшенням вмісту загального білка сечі в 1,8 разів. Ефект від застосування екстракту зимолюбки очікувано виявляв дозозалежність. В умовах розвитку ниркової недостатності у щурів досліджений екстракт зимолюбки покращував фізичний стан тварин, зменшував їхню смертність, покращував видільну функцію нирок, нормалізував азотистий й білковий обмін, сприяв захисту структури ниркової тканини, а отже, мав позитивний вплив на перебіг нефропатії. В експериментальних дослідженнях екстракт зимолюбки мав виражену нефропротекторну й гіпоазотемічну дію і може бути перспективним засобом для лікування хронічної хвороби нирок.

Досліджено вплив екстракту трави зимолюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок щурів. Екстракт трави зимолюбки зонтичної сприяв захисту морфоструктури ниркової тканини щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю, знижував ступені ураження ниркових тілець та каналців. За виразністю нефропротективних властивостей екстракт зимолюбки зонтичної поступався референс-препарату розчину леспефрину за впливом на стан гломерулярного апарату та випереджав його за впливом на

стан каналцевої системи. Найбільш чутливими до дії екстракту виявились міграційна та проліферативні функції клітин, менш чутливими – енергетична, піноцитозна та збереження морфологічної цілісності.

На етапі вивчення протизапальних властивостей екстракту трави зимолюбки зонтичної досліджено антиексудативну дію на моделі асептичного ексудативного запалення. З цією метою в ході експерименту було застосовано модель карагенінового набряку стопи у лабораторних щурів. У ході даного експерименту проводили скринінг протизапальної активності для наступних зразків: етанольний екстракт (50 %) трави зимолюбки зонтичної – 1:5 (CE5); етанольний екстракт (70 %) трави зимолюбки зонтичної – 1:5 (CE7); водний екстракт трави зимолюбки зонтичної – 1:10 (BE). Усі досліджувані зразки продемонстрували статистично значущий ефект на 3 годину дослідження. Експериментально значущим, для фармакологічного вивчення протизапальних засобів значущим є рівень фармакологічної активності не менш 20 %. Тест-зразки CE7 та CE5 у дозі 1 мл/кг, що продемонстрували усереднену протизапальну активність на відповідному рівні, рекомендовані для подальших досліджень.

Досліджено антимікробні властивості екстракту трави зимолюбки зонтичної на базі ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова" під керівництвом завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології к.біол.н., ст.н.с. Осолодченко Т.П. Експериментально встановлено, що досліджуваний зразок зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий проявляє антибактеріальну активність по відношенню до музейних штамів: грампозитивні мікроорганізми *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, спорову культуру *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамнегативні *Proteus vulgaris* ATCC 4636 та *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 та клінічних штамів: *Staphylococcus aureus* 124, *Enterococcus faecalis* 42, *Pseudomonas aeruginosa* 18, *Klebsiella pneumoniae* 64, *Candida albicans* 69.

Розроблено технологію отримання таблеток з екстрактом зимолюбки зонтичної трави методом подвійної грануляції. Визначено адсорбційну

властивість та її вплив на процес таблетування синтетичної аморфної форми алюмометасиліката магнію (Neusilin US2) та мікрокристалічної целюлози 101 (МСС 101) при використанні даних речовин в якості носія для зимолюбки зонтичної трави екстракту рідкого. Доведена можливість проведення процесу подвійного гранулювання при використанні мікрокристалічної целюлози 101 (МСС 101) згідно заданої кількості рідкого екстракта. За допомогою математичного планування експерименту підібрані умови сушіння грануляту та кількісний склад ексципієнтів.

На підставі проведених досліджень теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено оптимальний склад таблеток із вмістом рідкого екстракта зимолюбки: МКЦ – 56,89 %; Рідкий екстракт зимолюбки (з вмістом сухих речовин 47,0 %) – 40,11 %; Vivasol – 2,0 %; магнію стеарат – 1,0 %, обґрунтовано їх технологію одержання методом подвійного гранулювання пресування з двоетапним введенням рідкого екстракта зимолюбки,

За результатами експериментальних досліджень розроблено проекти методів контролю якості «Зимолюбки зонтичної трава», «Зимолюбки зонтичної екстракт рідкий», «Таблетки із вмістом зимолюбки зонтичної трави екстрактом рідким», розроблено проекти технологічного регламенту на виробництво зимолюбки зонтичної трави екстракту рідкого та виробництво таблеток із вмістом зимолюбки зонтичної трави екстрактом рідким.

Результати досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу споріднених кафедр закладів вищої освіти України та наукових установ.

Ключові слова: зимолюбка зонтична, лікарська рослинна сировина, якісний аналіз, кількісне визначення, стандартизація, рідкий екстракт, діуретична активність, протизапальна активність, антимікробна активність.

Список публікацій здобувача, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Статті у наукових фахових виданнях

1. Kovregin O., Prokopiuk V., Lytkin D., Vladymyrova I. Study of the influence of the extract of pipsissewa on cell cultures. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 3(49). P. 78-85. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.307291 (*Особистий внесок* – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Прокопюк В.Ю. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).
2. Kovregin O., Lytkin D., Mykhailenko O., Ivanauskas L., Yudkevych T., Vladymyrova I., Khodak L., Starikov V. Study of phenolic compounds of umbellate wintergreen herb and their influence on biochemical indicators of blood and urine in the rat model of chronic kidney disease. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 4(50). P. 44-52. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.310744 (*Особистий внесок* – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні частини фітохімічного дослідження; Л. Іванаускас – участь в аналізі результатів фітохімічної частини дослідження; Литкін Д.В. – допомога в проведенні частини фармакологічного дослідження; Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні частини фармакологічного дослідження; Ходак Л.А. – участь в аналізі результатів фармакологічної частини; Старіков В.І. – участь в аналізі результатів фармакологічної частини).
3. Kovregin O., Laryanovska Y., Yudkevych T., Lytkin D., Lebedinets I., Vladymyrova I. Investigation of the influence of the extract of the herb of umbellate wintergreen on the structural and functional state of the kidneys of rats. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 5(51). P. 89-95. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.314121 (*Особистий внесок* – збір та аналіз даних, участь у

проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження; Лар'яновська Ю.Б. – допомога в проведенні дослідження з вивчення структурно-функціонального стану нирок та аналізі результатів; Лебединець І.О. – допомога в проведенні дослідження з вивчення структурно-функціонального стану нирок; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

4. Коврегін О. В., Литкін Д. В., Владимірова І. М., Юдкевич Т. К. Скринінгові дослідження протизапальної активності екстрактів із зимолубки зонтичної трави. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2024. № 3(59). С. 42-46. (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

5. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Вивчення амінокислотного складу трави зимолубки зонтичної (*Chimaphila umbellata* L.). *Фармацевтичний журнал*. 2024. Т. 79, № 4. С.63-71. DOI: 10.32352/0367-3057.4.24.06 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Л. Іванаускас – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

6. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Ідентифікація фенольних сполук зимолубки зонтичної методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії. *Health&Education*. 2024. № 3. С. 58-63. DOI: 10.32782/health-2024.3.7 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач

дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Л. Іванаускас – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

7. Kovregin O., Soldatov D., Kukhtenko O., Vladymyrova I. Development of technology for obtaining tablets by double granulation method with Pipsissewa (*Chimaphilla Umbellata*) extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. № 6(52). С. 124–133. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.318519 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Кухтенко О.С. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Солдатов Д.П. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

8. Коврегін О., Махія Л., Владимірова І. Мікроскопічні та гістохімічні дослідження трави зимолубки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* (L.) W. Barton). *Фітотерапія. Часопис*. 2024. № 4. С. 224–231. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-4-224 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Махія Л.М. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

9. Kovregin O. V., Osolodchenko T. P., Vladymyrova I. M. The Study of the Antibacterial Effect of the Umbellate Wintergreen Extract. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2024, 22 (4). P. 43-47. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.24.324652> (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Осолодченко Т.П. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

Тези

1. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична як перспективний вид лікарської рослинної сировини. *Youth Pharmacy Science* : матеріали II Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 груд. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 61-62.
2. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична: лікувальні властивості та застосування у медицині. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 42.
3. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення мінерального складу зимолюбки зонтичної трави. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали V Міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 23-25 листоп. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 73-74.
4. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення показників якості зимолюбки зонтичної трави. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали XXIX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів*, м. Харків, 19-21 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 46-47.
5. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Скринінгові дослідження протизапальних властивостей водного екстракту зимолюбки лікарської. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали XXX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів*, м. Харків, 17-19 квіт. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 64-65.

ANNOTATION

Kovregin O.V. Pharmacognostic study of the herb and extracts of umbellate wintergreen (*Chimaphilla umbellata* L.) for the creation of phytopreparations. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, Industrial Pharmacy” (22 – Health Care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2025.

The dissertation presents a pharmacognostic study of the herb umbellate wintergreen, the production of herbal remedies, the standardization of raw materials and the resulting herbal remedies.

The *first* section of the dissertation analyzes the scientific literature on the botanical characteristics, chemical composition and pharmacological properties of umbellate wintergreen. It was found that umbellate wintergreen (*Chimaphilla umbellata* (L.)) is a perennial herbaceous plant that has diuretic, astringent, analgesic and other effects; and can be used for the prevention and treatment of kidney and urinary tract diseases. In the umbellate wintergreen herb, glycoside arbutin, tannins (up to 5%), flavonoids, tannins, bitter substance (urson), organic acids, gums, resins, mucus were found. The herb also contains sitosterol, quinic and gallic acids, methyl ester of salicylic acid, vitamins, trace elements and other biologically active substances. It has been studied that herbal remedies have a positive effect on diseases of the kidneys and urinary organs.

To date, no pharmacognostic study of the umbellate wintergreen herb growing in Ukraine has been conducted, and there are no regulatory indicators for the standardization parameters of the umbellate wintergreen raw material, which determines the relevance of the chosen topic.

The *second* section presents a description of the research object, provides information on the methods, reagents and techniques used to study the qualitative composition and determine the quantitative content of biologically active substances

in the umbellate wintergreen herb, study of plant substances and obtained tablets. Also, pharmacological research methods for determining the properties of the raw material and the obtained extracts are presented.

The *third* section contains the results of a phytochemical study of umbellate wintergreen grass. The phenolic compounds of umbellate wintergreen herb were studied using a modern method of high-performance thin-layer chromatography (HPLC). As a result of the analysis of chromatographic profiles obtained from raw material samples, zones at the level of hyperoside, avicularin and isoquercetin were identified in comparison with the zones of standard samples. Comparison of the zones in umbellate wintergreen grass with the zones of standards confirmed the presence of hyperoside (Rf 0.41), avicularin (Rf 0.67), isoquercetin (Rf 0.45), gallic (Rf 0.81), caffeic acids (Rf 0.87) in the studied raw material.

The quantitative content of phenolic compounds was determined by high-performance liquid chromatography. 8 phenolic compounds were identified and quantified by HPLC: apigenin, hyperoside, quercitrin, rutin, quercetin, gallic acid, guayaverine, and isoquercetin. To assess the antioxidant potential of individual phenolic compounds in vitro in umbellate wintergreen, the HPLC/ABTS method with post-column derivatization was used. Based on the results of a preliminary assessment of the antioxidant contribution of individual phenolic compounds to the overall effectiveness of the umbellate wintergreen extract, a significant effect of caffeic acid and quercetin derivatives was determined.

Quantitative determination of amino acids was performed by GC-MS. According to the results of the study, the content of amino acids ($\mu\text{g/g}$) was established in the following decreasing order: L-glutamic acid (14.47)>L-alanine (4.03)>L-aspartic acid (3.31)> L-valine (0.26)> L-proline (0.17)> isoleucine (0.13)> L-leucine (0.05).

21 herb-distillable substances were identified and quantified by GC-MS in umbellate wintergreen. Alcohols (hexanol-3, octanol-3), aldehydes, acetals and ketones (hexanal, octanone-3, hexahydrofarnesylacetone), terpenoids (β -bourbonene, β -elemene, α -selinene, γ -cadinene, calaminene, dihydroactinide,

spatulane, caryophyllene oxide), alkanes (tetradecane), derivatives of aromatic carboxylic acids (phthalate), phenolic compounds – flavone, alkanes (heptacosane, nonacosane), alkadienes (1,21-docosadiene), phytosterols (γ -sitosterol) were identified.

Comprehensive microscopic studies were conducted for the first time and diagnostic features of umbellate wintergreen were established:

The leaf of *Chimaphilla umbellata* is dorsoventral and hypostomatic. Layers of cutin are prominently deposited on the surface of both the adaxial and abaxial epidermis.

The lower epidermis consists of sinuously walled cells with thick walls and simple, straight pores. It is densely populated with actinocytic stomatal complexes.

The cells of the upper epidermis have a more regular elongated-rectangular shape with slight sinuous bends. Their cell walls are thickened with simple, straight pores. Near the veins, clusters of calcium oxalate crystals—druses—are concentrated.

The stem is covered with periderm, with a heterogeneous upper row of cells consisting of epidermal remnants. Its outer surface has a well-developed cuticular layer, characteristic of xerophytic plants, with warty, papilla-like trichomes.

To confirm the presence of certain biologically active compounds, a series of histochemical reactions were conducted: the reaction with Sudan III gave a positive result for substances of a lipid nature; with FeCl_3 , the presence of tannins was determined; the reaction with diluted nitric acid determined arbutin in the epidermis, cross-section of the stem and leaf; to establish cells with lignified shells, phloroglucinol with concentrated hydrochloric acid was used, under the action of which the lignified shells acquired a bright crimson color.

The content of macro- and microelements in umbellate wintergreen herb was studied by atomic emission spectroscopy. Among the elements with the highest content ($\mu\text{g}/100\text{g}$), it is worth noting sodium (862.00), potassium (1368.00), silicon (420.00), magnesium (231.00), phosphorus (125.00); among microelements: calcium (530.00), manganese (18.00), iron (9.00).

The *fourth* section provides a definition of the quality indicators of umbellate wintergreen grass: loss in mass upon drying ($7.15 \pm 0.11\%$), total ash ($2.90 \pm 0.10\%$), ash insoluble in hydrochloric acid ($1.10 \pm 0.12\%$), content of foreign impurities ($3.89 \pm 0.18\%$) and technological parameters of the raw material: degree of grinding of the raw material; specific surface area of the raw material particles; absorption of the extractant by the raw material; specific, volumetric and bulk density, porosity and graininess, free volume of the raw material layer. The optimal extractant was determined to be 50% ethanol.

A liquid extract was obtained from the umbellate wintergreen herb and its standardization parameters were proposed: description, solubility, identification of acid flavonoids by TLC, heavy metal content, dry residue content, ethanol content, microbiological purity, quantitative content of the sum of flavonoids in terms of hyperoside (was not less than 1.5%).

For the obtained liquid extract from the umbellate wintergreen herb, its pharmacological properties were investigated.

The study of the effect of umbellate wintergreen herb extract on cell cultures of the L929 line (mouse adipose tissue fibroblasts) was carried out at the Institute of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. The cells were cultured in DMEM medium (Bio West, France) enriched with 10% FBS (Lonza, Germany) with 1% antibiotic-antimycotic (Bio West, France), in a CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific, USA) at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. The determination of the minimum toxic concentration was assessed by morphological signs of the cells and it was established that the umbellate wintergreen extract had a toxic effect on L929 cells when added to the cultivation medium at a concentration above 0.01%. At the same time, the toxic effect had a threshold effect. The most sensitive were the migratory and proliferative functions of the cell, less sensitive were the energetic, pinocytotic and preservation of the morphological integrity of the cells. According to the results obtained, it was proposed to use concentrations of 0.05; 0.02, 0.01; 0.005% of umbellate wintergreen extract for further research.

Determination of antioxidant activity and study of nephroprotective effect were carried out on a model of chromate-induced renal failure (chronic kidney disease) in rats based on the educational and scientific training laboratory of medical and biological research of the Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy of National university of Pharmacy. The use of wintergreen extract in experimental animals was noted by normalization of diuresis, a decrease in the content of total urine protein by 1.8 times. The effect of the use of umbellate wintergreen extract was expected to be dose-dependent. In conditions of development of renal failure in rats, the studied umbellate wintergreen extract improved the physical condition of animals, reduced their mortality, improved the excretory function of the kidneys, normalized nitrogen and protein metabolism, contributed to the protection of the structure of renal tissue, and therefore had a positive effect on the course of nephropathy. In experimental studies, umbellate wintergreen extract had a pronounced nephroprotective and hypoazotemic effect and may be a promising agent for the treatment of chronic kidney disease.

The effect of umbellate wintergreen herb extract on the structural and functional state of rat kidneys was studied. The extract of umbellate wintergreen herb contributed to the protection of the morphostructure of the renal tissue of rats with chromate-induced renal failure, reduced the degree of damage to renal corpuscles and tubules. In terms of the expressiveness of nephroprotective properties, the extract of umbellate wintergreen was inferior to the reference preparation of the solution of lespefril in terms of its effect on the state of the glomerular apparatus and surpassed it in terms of its effect on the state of the tubular system. The most sensitive to the action of the extract were the migratory and proliferative functions of cells, less sensitive - energy, pinocytosis and preservation of morphological integrity.

At the stage of studying the anti-inflammatory properties of the umbellate wintergreen herb extract, the antiexudative effect was investigated on a model of aseptic exudative inflammation. For this purpose, a model of carrageenan foot edema in laboratory rats was used in the experiment. During this experiment, anti-

inflammatory activity screening was performed for the following samples: ethanol extract (50%) of umbellate wintergreen herb – 1:5 (CE5); ethanol extract (70%) of umbellate wintergreen herb – 1:5 (CE7); water extract of umbellate wintergreen herb – 1:10 (BE). All studied samples demonstrated a statistically significant effect at the 3rd hour of the study. Experimentally significant, for the pharmacological study of anti-inflammatory agents, the level of pharmacological activity is not less than 20%. Test samples CE7 and CE5 at a dose of 1 ml/kg, which demonstrated average anti-inflammatory activity at the appropriate level, are recommended for further research.

The antimicrobial properties of the umbellate wintergreen herb extract were studied at the Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology under the guidance of the head of the laboratory of biochemistry and biotechnology, candidate of biological sciences, senior researcher Osolodchenko T. P. It was experimentally established that the studied sample of umbellate wintergreen herb liquid extract exhibits antibacterial activity against test strains: gram-positive microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, spore culture *Bacillus subtilis* ATCC 6633, gram-negative *Proteus vulgaris* ATCC 4636 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 and clinical strains: *Staphylococcus aureus* 124, *Enterococcus faecalis* 42, *Pseudomonas aeruginosa* 18, *Klebsiella pneumoniae* 64, *Candida albicans* 69.

A technology for obtaining tablets with umbellate wintergreen herb extract by the double granulation method has been developed. The adsorption property and its influence on the tableting process of synthetic amorphous form of magnesium aluminometasilicate (Neusilin US2) and microcrystalline cellulose 101 (MCC 101) have been determined when using these substances as a carrier for umbellate wintergreen herb liquid extract. The possibility of carrying out the double granulation process using microcrystalline cellulose 101 (MCC 101) according to a given amount of liquid extract has been proven. Using mathematical planning of the experiment, the drying conditions of the granulate and the quantitative composition of excipients have been selected.

Based on the conducted research, the optimal composition of tablets

containing liquid umbellate wintergreen extract was theoretically substantiated and experimentally confirmed: MCC – 56.89%; liquid umbellate wintergreen extract (with a dry matter content of 47.0%) – 40.11%; vivasol – 2.0%; magnesium stearate – 1.0%, and their production technology was substantiated by the method of double granulation pressing with a two-stage introduction of liquid umbellate wintergreen extract.

Based on the results of experimental research, draft quality control methods for “Umbellate wintergreen herb”, “Umbellate wintergreen liquid extract”, “Tablets containing Umbellate wintergreen liquid extract” were developed, a draft technological regulations have been developed for the production of Umbellate wintergreen liquid extract and the production of Tablets containing Umbellate wintergreen liquid extract.

The results of the research were implemented in the research work of related departments of higher education institutions of Ukraine and scientific institutions.

Keywords: umbellate wintergreen, medicinal plant raw materials, qualitative analysis, quantitative determination, standardization, liquid extract, diuretic activity, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	23
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, АРЕАЛ ПОШИРЕННЯ, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИЦИНІ І ФАРМАЦІЇ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ (Огляд літератури)	29
1.1 Ботанічна характеристика та ареал поширення зимоліюбки зонтичної .	29
1.2 Стан фітохімічних досліджень роду <i>Chimaphilla</i> у сучасних джерелах наукової літератури.....	30
1.3 Фармакологічна властивості та застосування зимоліюбки зонтичної	38
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
2.1 Характеристика об'єктів дослідження.....	42
2.2 Відомості про прилади, методи і реактиви	43
2.3 Методики дослідження якісного складу та визначення вмісту біологічно активних речовин у траві зимоліюбки зонтичної	44
2.4 Дослідження фармакологічних властивостей екстракту зимоліюбки трави	50
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ, ВСТАНОВЛЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТРАВИ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ.....	59
3.1 Дослідження якісного складу та кількісного вмісту фенольних сполук у траві зимоліюбки зонтичної.....	59
3.2 Дослідження амінокислотного складу трави зимоліюбки зонтичної.....	65
3.3 Дослідження біологічно активних речовин, що переганяються з водяною парою	68
3.4 Дослідження макро- та мікроелементного складу трави зимоліюбки зонтичної.....	70
3.5 Визначення мікроскопічних діагностичних ознак та гістохімічні дослідження трави зимоліюбки зонтичної	71

3.6 Визначення параметрів стандартизації трави зимолюбки зонтичної.....	86
Висновки до розділу 3	90
РОЗДІЛ 4 ОДЕРЖАННЯ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ ТРАВИ ЕКСТРАКТУ РІДКОГО, ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ТА ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ. ОДЕРЖАННЯ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТАБЛЕТОК З ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ ЕКСТРАКТОМ	93
4.1 Визначення показників якості та технологічних параметрів трави зимолюбки зонтичної	93
4.2 Отримання рідкого екстракту зимолюбки зонтичної	96
4.3 Визначення параметрів стандартизації рідкого екстракту трави зимолюбки зонтичної	99
4.4 Дослідження фармакологічних властивостей екстракту трави зимолюбки зонтичної	100
4.4.1 Дослідження впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної на культуру клітин	100
4.4.2 Визначення антиоксидантної дії та визначення нефропротекторного впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної.....	107
4.4.3 Дослідження впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок у щурів.....	110
4.4.4 Дослідження протизапальної активності екстракту трави зимолюбки зонтичної.....	122
4.4.5 Дослідження антимікробної дії екстракту трави зимолюбки зонтичної.....	124
4.5 Розробка твердої лікарської форми з екстрактом зимолюбки зонтичної трави рідким	130
4.5.1 Підходи до використання технології liquisolid (LSS)	131
4.5.2 Використання мікрокристалічної целюлози в технології liquisolid при розробці таблеток із рідким екстрактом зимолюбки	136
4.5.3 Застосування подвійного гранулювання при розробці таблеток....	139

4.5.4 Підбір складу допоміжних речовин таблеток із використанням методу математичного планування експеримента (МПЕ)	142
4.5.5 Технологічна схема виробництва таблеток із використанням методу подвійного гранулювання у промислових умовах	149
Висновки до розділу 4	153
ВИСНОВКИ.....	156
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	160
ДОДАТКИ.....	175

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР – біологічно активні речовини

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія

ГХ-МС – газова хроматографія (мас-детектування)

ДФУ 2.0 – Державна Фармакопея України 2 видання

ЛРС – лікарська рослинна сировина

МКЯ – методи контролю якості

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетова область

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Застосування терапевтичного потенціалу лікарських рослин на сьогодні вважають досить фізіологічним методом профілактики та лікування, який впливає на нормалізацію обмінних процесів та відновлення функціональних можливостей організму [90]. Лікарські засоби, створені на основі рослин, можна застосовувати більш тривалий час, у тому числі в терапії хвороб, що мають хронічний перебіг [46].

Тому роль фітотерапії в сучасній медицині постійно зростає, що зумовлено, з одного боку, незначною токсичністю і біологічною безпекою для організму людини більшої кількості рослинних ліків, з іншого – особливостями клінічної ефективності фітотерапевтичних препаратів [27, 46].

З огляду на вищезазначене, фармакогностичне вивчення рослин та створення на їх основі лікарських засобів є актуальним завданням фармацевтичної науки. Особливої уваги в цьому аспекті заслуговують рослини вітчизняної флори [28].

Так, зимолобка зонтична (*Chimaphilla umbellata* L.) – багаторічна рослина, родини Вересових (*Ericaceae*). Зростає в помірному кліматі, частіше в лісових зонах. Територіально зимолобка поширена в Україні, у Західній Скандинавії, на Далекому Сході тощо. Зустріти її можна у сухих хвойних лісах, а також в лісовій зоні серед чагарників.

У лікувальних цілях збирають траву зимолобки зонтичної (стебла, листя і квітки), рідше – коріння. Траву заготовляють у період цвітіння рослини [27].

Зимолобка зонтична має достатню сировинну базу.

Рослина містить широкий спектр груп біологічно активних речовин: глікозид арбутин, фенольні сполуки, флавоноїди, гірку речовину (урсон), органічні кислоти, ситостерин, дубильні речовини, вітаміни, мікроелементи, хімафілін.

Зимолюбка має дезінфікуючу, антисептичну, протизапальну, виражену сечогінну дію, сприяє виведенню азотистих і хлористих солей з організму, нормалізації травлення і підвищенню апетиту, а при діабеті – зниженню вмісту цукру в крові [61].

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

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом експертної проблемної комісії Національного фармацевтичного університету і є фрагментом комплексної науково–дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було фармакогностичне вивчення трави зимолюбки зонтичної, одержання фітозасобів, стандартизація сировини та розроблених рослинних засобів.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені такі завдання:

- провести аналіз сучасної наукової літератури щодо ботанічної характеристики, ареалу поширення, хімічного складу та застосування у медицині і фармації зимолюбки зонтичної;
- дослідити якісний склад БАР у траві зимолюбки зонтичної;
- встановити кількісний вміст БАР у траві зимолюбки зонтичної;
- визначити діагностичні макро- та мікроскопічні ознаки трави зимолюбки зонтичної;
- визначити числові показники якості, технологічні параметри сировини зимолюбки зонтичної та запропонувати параметри її стандартизації;
- на основі сировини зимолюбки зонтичної одержати екстракт рідкий, визначити параметри стандартизації та дослідити фармакологічні властивості;

- розробити склад та технологію отримання таблеток з екстрактом зимолюбки зонтичної.

Об'єкт дослідження – фармакогностичне дослідження трави зимолюбки зонтичної та лікарських засобів на її основі.

Предмет дослідження – дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР у траві зимолюбки зонтичної, одержання фітозасобів, стандартизація сировини та одержаних рослинних засобів, вивчення діуретичної, протизапальної, антимікробної та антиоксидантної дії розроблених фітозасобів.

Методи дослідження

Дослідження якісного складу та визначення вмісту БАР у траві зимолюбки зонтичної проводили методами ТШХ, ГХ-МС, ВЕРХ, ВЕТШХ, атомно-емісійним, спектрофотометричним методами. Вивчення анатомічної будови сировини здійснювали за допомогою мікроскопу та фотокамери. Фармакологічні дослідження одержаного екстракту проводили *in vitro* та *in vivo*. Статистичну обробку результатів експериментальним досліджень проводили відповідно до вимог ДФУ.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше проведено фармакогностичне дослідження трави зимолюбки зонтичної, що зростає в Україні. Визначено вміст фенольних сполук, флавоноїдів, амінокислот, мінеральних речовин та речовин, що переганяються з водяною парою.

Уперше досліджені мікроскопічні діагностичні ознаки вітчизняної трави зимолюбки зонтичної. За допомогою гістохімічних реакцій у сировині виявлені ліпофільні сполуки (кутин та краплі ліпідної природи), дубильні речовини, арбутин, виявлені клітини з лігніфікованими стінками.

Уперше одержано зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий, визначено параметри його стандартизації, доведено протизапальну, антимікробну, антиоксидантну, нефропротекторну й гіпоазотемічну дії.

Уперше розроблено технологію одержання таблеток з зимолюбки зонтичної трави екстрактом рідким методом подвійної грануляції та визначені їх технологічні параметри.

Практичне значення отриманих результатів

За результатами експериментальних досліджень розроблено проекти методів контролю якості «Зимолюбки зонтичної трава», «Зимолюбки зонтичної екстракт рідкий», «Таблетки із вмістом зимолюбки зонтичної трави екстрактом рідким», розроблено проекти технологічного регламенту на виробництво зимолюбки зонтичної трави екстракту рідкого та виробництво таблеток із вмістом зимолюбки зонтичної трави екстрактом рідким.

Результати досліджень впроваджено у науково-дослідну роботу споріднених кафедр закладів вищої освіти України та наукових установ: кафедри фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармації факультету післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; відділу кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором: • проведено аналіз вітчизняних та іноземних джерел сучасної наукової літератури щодо ботанічної характеристики, хімічного складу, застосування у медицині і фармації зимолюбки зонтичної; • досліджено якісний склад і визначено кількісний вміст БАР у траві зимолюбки зонтичної; • визначено мікроскопічну будову трави зимолюбки зонтичної та визначено діагностичні ознаки сировини та ідентифіковані БАР гістохімічними реакціями; • одержано рідкий екстракт трави зимолюбки зонтичної, визначені параметри його стандартизації, досліджені протизапальна, антимікробна, антиоксидантна й нефропротекторна дії; • розроблено технологію одержання таблеток з екстрактом трави зимолюбки зонтичної та визначені їх технологічні параметри.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Владимировою І.М., Прокопюком В.Ю., Литкіним Д.В., Михайленко О.О., Людасом Іванаускасом, Юдкевич Т.К., Лар'яновською Ю.Б., Лебединець І.О., Махиною Л.М., Осолодченко Т.П., Кухтенко О.С., Солдатовим Д.П., Ходак Л. А., Старіковим В. І. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: II Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Youth Pharmacy Science» (Харків, 7-8 грудня 2021 р.); VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р.); матеріали V Міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 23-25 листопада 2022 р.); XXIX Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 19-21 квітня 2023 р.); XXX Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 17-19 квітня 2024 р.).

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 191 сторінці друкованого тексту, складається із анотації, вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 150 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 27 таблицями та 55 рисунками. Список використаних джерел містить 128 найменувань, з них 51 кирилицею та 77 латиницею.

РОЗДІЛ 1

БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, АРЕАЛ ПОШИРЕННЯ, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИЦИНІ І ФАРМАЦІЇ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ (Огляд літератури)

1.1 Ботанічна характеристика та ареал поширення зимолюбки зонтичної

Зимолюбка зонтична (*Chimaphilla umbellata* L.) – багаторічна рослина, родини Вересових (*Ericaceae*) заввишки 25 см, з повзучим кореневищем та ребристим здерев'янілис при основі стеблом. Листя вічнозелене, шкірясте, зверху темно-зелене, знизу світлого кольору, форма видовженояйцеподібна, коай пильчатий. Квітки зібрані по 2-7 у зонтикоподібне суцвіття. Зростає в помірному кліматі, частіше в лісових зонах. Територіально зимолюбка поширена в Україні, у Західній Скандинавії, на Далекому Сході тощо. Зустріти її можна у сухих хвойних лісах, а також в лісовій зоні серед чагарників. У лікувальних цілях збирають траву зимолюбки зонтичної (стебла, листя і квітки), рідше – коріння. Траву заготовляють у період цвітіння рослини [27].

Chimaphilla umbellata (L.) (рис. 1.1) вивчається вже майже два століття, а перша стаття, присвячена фітохімії рослини, була опублікована у 1860 р. Чимало сучасних досліджень зосереджені на біотехнологічних досягненнях *C. umbellata* (L.), включаючи її використання як природної альтернативи в косметичній, харчовій, біопаливній та медичній промисловості з особливою увагою до її терапевтичного застосування [54]. Сполука хімафілін дала назву роду. Вміст хімафіліну зменшується від коренів до плодів, причому останні не виробляють його. *C. umbellata* (L.), євразійська рослина, зустрічається майже у всій Північній Америці та поширена в прохолодній помірній північній півкулі [62].

Рід *Chimaphilla* є типовим представником родини *Ericaceae*, який у природі поширений в Бутані, Китаї, Японії, Кореї тощо; він включає близько п'яти видів у всьому світі, з яких три види (один з яких є ендемічним) можна

знайти в Китаї. *Chimaphilla umbellata* (L.) – багаторічна трав'яниста рослина, що має сечогінну, в'яжучу, болезаспокійливу дію і може застосовуватись при порушеннях функціонування сечо-вивідної системи [27].

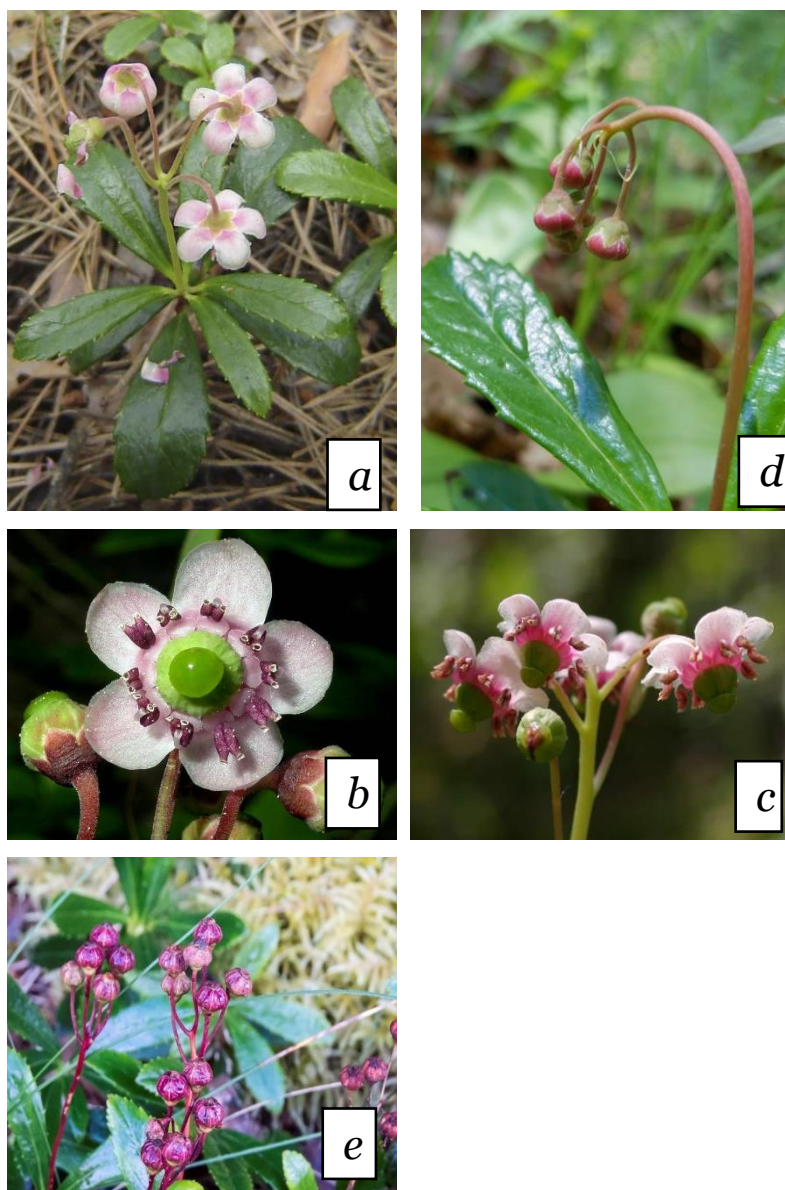


Рис. 1.1 Зовнішній вигляд *Chimaphilla umbellata* L.: а – квіткова рослина; б – одиночна квітка; с – квітки; d – квіткові бруньки; е – молоді плоди

1.2 Стан фітохімічних досліджень роду *Chimaphilla* у сучасних джерелах наукової літератури

У траві зимолюбки зонтичної містяться глікозид арбутин, дубильні речовини (до 5 %), флавоноїди, таніни, гірку речовину (урсон), органічні

кислоти, камеді, смоли, полісахариди тощо. А також ситостерин, хінна і галова кислоти, метиловий ефір саліцилової кислоти, вітаміни, мікроелементи та інші біологічно активні речовини [65, 106]. Засоби, що містять траву зимолубки зонтичної, мають дезінфікуючу, антисептичну, протизапальну, виражену сечогінну дію [23]. Трава зимолубки сприяє виведенню азотистих і хлористих солей з організму, нормалізації травлення і підвищенню апетиту, а при діабеті – зниженню вмісту цукру в крові [22, 49].

У світовій науковій літературі представлені відомості щодо речовин фенольної природи у траві зимолубки у джерелах [61]. У дослідженому етанольному екстракті *C. umbellata* (L.) авторами статті були визначені фенольні сполуки [4] (рис. 1.2).

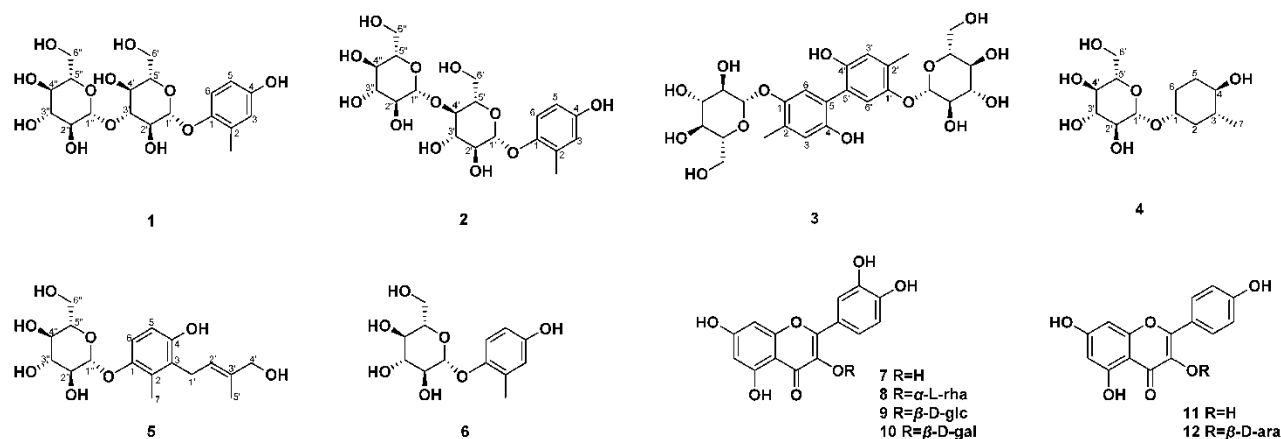


Рис. 1.2 Фенольні сполуки екстракту *C. umbellata* (L.): глюкопіранозил-ізогемоарбутин (1), 4'-O-β-D-глюкопіранозил-ізогемоарбутин (2) і 5-5'-дегідро-ді(2-метил-4-гідрокси-феніл-1-O-β-D-глюкопіранозид) (3); циклогексанол: (1R,3R,4R)-3-метилциклогексанол β-D-глюкопіранозид (4); 3-[(E)-4-гідрокси-3-метил-2-бутеніл]-4-гідрокси-2-метилфеніл-O-β-D-глюкопіранозид (5); ізогемоарбутин (6), кверцетин (7), кверцитрин (8), ізокверцитрин (9), гіперозид (10), кемпферолом (11) і югланін (12)

Фракціонування етанольних екстрактів *Chimaphilla umbellata* (L.) W. Bart дозволило ідентифікувати 2,7-диметил-1,4-нафтохінон (хімафілін) як основний протигрибковий компонент. Структуру хімафіліну підтверджено за

допомогою ЯМР-спектроскопії ^1H і ^{13}C . Протигрибкову активність хімафіліну оцінювали за допомогою методу мікророзведення з *Saccharomyces cerevisiae* (0,05 мг/мл) і асоційованими з лупою грибами *Malassezia globosa* (0,39 мг/мл) і *Malassezia restricta* (0,55 мг/мл). Виражену антиоксидантну активність екстракту *C. umbellata* також було виявлено за допомогою аналізу DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил), що свідчить про те, що цей фітопрепарат має антиоксидантну функцію при загоєнні ран. Хіміко-генетичний профіль був завершений за допомогою хімафіліну з використанням приблизно 4700 мутантів із делецією гена *S. cerevisiae*. Клітинні ролі видалених генів у найбільш чутливих мутантах і вторинні аналізи вказують на те, що мішені для хімафіліну включають шляхи, залучені в біогенез клітинної стінки та транскрипцію [89, 95].

З трави *Chimaphilla* було виділено 23 сполуки, у тому числі тритерпеноїди (1–10), флавоноїди (11–16), стероли (17 і 18), хінони (19 і 20), похідне сахариду (21), фенольний глікозид (22) і глікозид мегастигману (23). Структури цих ізольованих сполук були ідентифіковані за допомогою спектроскопії ЯМР (^1H і ^{13}C). Усі сполуки, крім 19 і 22, були зареєстровані вперше. Серед них 16 сполук (1–4, 6–9, 12, 13, 15, 16, 18, 20, 21 і 23) вперше були зареєстровані з роду *Chimaphilla*, а сполуки 12, 16 і 23 були вперше виділені з родини *Ericaceae*.

Етанольні екстракти *Chimaphilla umbellata* (L.) виявляють антимікробні властивості проти всіх перевірених штамів, включаючи грамнегативні бактерії, такі як *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa* [77].

Сполуки, представлені на рис. 1.3, були виділені з *C. umbellata*. Фенольні сполуки відомі широким терапевтичним потенціалом, включаючи антиоксидантну активність, що виявляється у нейтралізації вільних радикалів завдяки своїм окисно-відновним властивостям; протиракову активність, яка посилює імунну систему для розпізнавання та знищення ракових клітин; антибактеріальну активність, яка пригнічує виробництво біоплівки та сприяє пригніченню бета-лактамази мікробів; потенціал захисту від ультрафіолету

завдяки пігментам, природним для фенолів, які поглинають ультрафіолет і захищають шкіру людини; протизапальну активність, що сприяє радикальній активності та модуляції ферментів; і кардіопротекторну діяльність, що призводить до зниження гіперліпідемії, пригнічення підвищеного АТ тощо [88, 96].

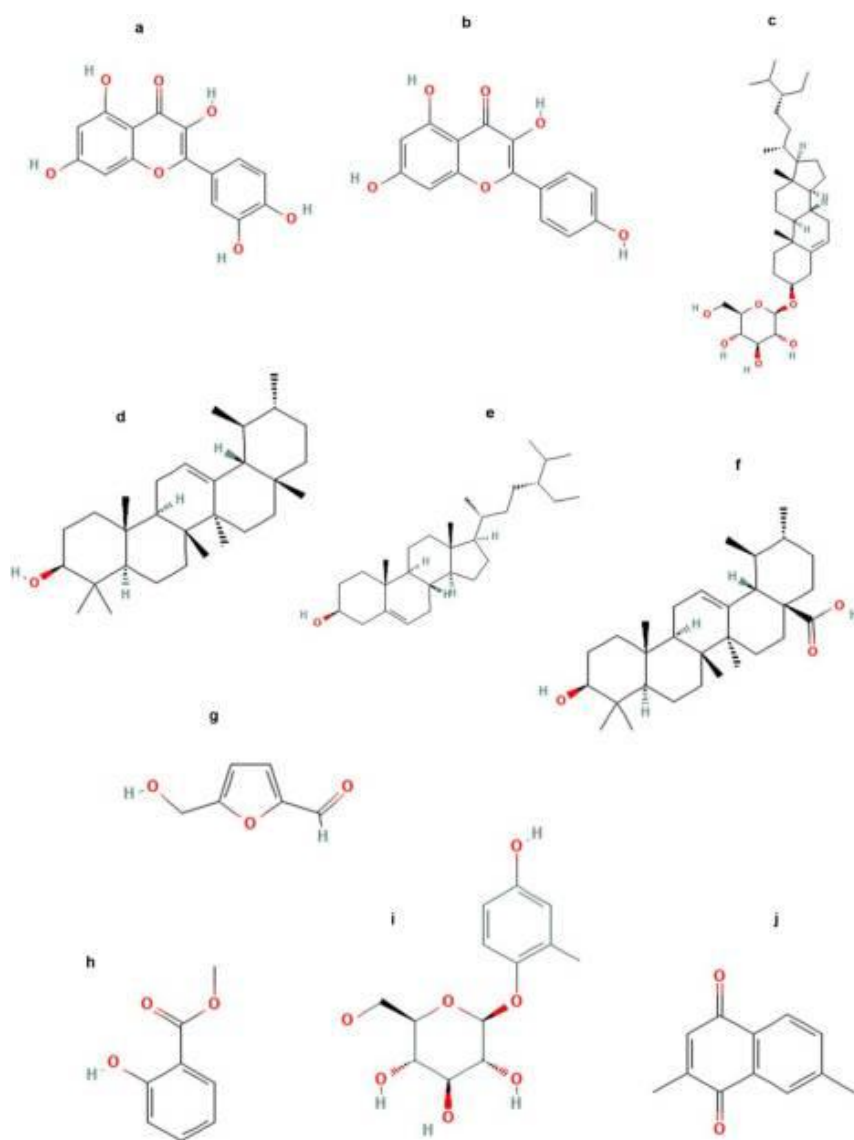


Рис. 1.3 БАР, отримані з *Chimaphilla umbellata*. а - кверцетин, б - кемпферол, с – даукостерол, d α-амірін, е – β-ситостерол, f - урсолова кислота, g - 5-гідроксиметилфурфурол, h - метилсаліцилат, і -ізогомоарбутин, j - хімафілін

Флавоноїди є важливим типом гідроксильованих фенольних сполук, які містять ароматичну кільцеву структуру, містить п'ять гідроксильних груп, що сприяють біологічній активності та похідним сполуки [87].

Кверцетин сприяє декільком фізіологічним процесам у рослинах, таким як ріст пилку, фотосинтез, антиоксидантний механізм і проростання насіння. Кверцетин широко використовується як харчова добавка і як фітохімічний засіб для лікування кількох захворювань, таких як ожиріння, діабет і порушення кровообігу. Антиоксидантна, протизапальна, протипухлинна, протидіабетична, протимікробна, ранозагоювальна та серцево-судинна дія кверцетину була широко досліджена [115].

Нещодавно було встановлено протиракову активність кверцетину проти різних ліній ракових клітин. Інтерлейкін 6 (IL-6) і С-реактивний білок (CRP) є поширеними маркерами запалення, а підвищені рівні IL-6 і CRP взаємопов'язані з підвищеним ризиком депресії та психічних. Дослідження на тваринах показали, що рівень експресії IL-6 може бути значно підвищений через введення ліпополісахариду як у селезінці, так і в мозку, що призводить до депресивної поведінки. Нещодавно було показано, що кверцетин може захищати від спричиненої стресом тривоги та поведінки, подібної до депресії, у самців мишей, на додаток до покращення пам'яті у цих тварин. Кверцетин може знизити рівень спричиненого стресом кортикотропін-рилізінг-фактора (CRF), який асоціюється з депресією та тривогою [6, 30].

Кемпферол є тетрагідроксифлавоном, який містить чотири гідроксигрупи, які присутні в положеннях 3, 5, 7 і 4. У рослинах кемпферол діє як молекула-попередник для біосинтезу вірусного респіраторного кофактора убіхінон. Кемпферол знижує ризик хронічних захворювань, перешкоджає росту та ангіогенезу ракових клітин і стимулює апоптоз ракових клітин, але, навпаки, кемпферол, здається, зберігає нормальну життєздатність клітин, у деяких випадках надаючи захисний ефект [45].

Введення кемпферолу підвищувало щільність кісткової тканини у щурів з остеопорозом після оваріектомії, сприяло остеогенній диференціації

мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (BMSCs), посилювало експресію RUNX2, Osterix і CXCL12 і знижувало експресію miR-10a-3p. Підтверджено, що miR-10a-3p і CXCL12 зв'язуються один з одним в аналізі можливого механізму, і що кемпферол сприяє остеогенній диференціації BMSC і полегшує остеопороз шляхом зниження miR-10a-3p і підвищення CXCL12.

Стерини використовуються для зниження рівня холестерину в організмі. У *Chimaphilla umbellata* екстракт містить два життєво важливі стерини – бета-ситостерол і даукостерол.

Бета-ситостерин має антиоксидантні властивості [107]. Також показано, що він модулює антиоксидантні ферменти та рецептори естрогену, зменшує кількість вільних радикалів і перекису водню, відіграє важливу роль у формуванні кровоносних судин, допомагає при загоєнні ран [108, 111].

Бета-ситостерин використовується для профілактики серцево-судинних захворювань, FDA схвалив його для гіперліпідемії. Він знижує рівень холестерину в плазмі, витісняючи його з міцел. Для підвищення ефективності інших статинів його додають у комбінації з іншими статинами [36].

Бета-ситостерин має протизапальну дію в клітинах аорти [56, 57], зменшує секрецію прозапальних цитокінів, TNF- α , а також набряк. З іншого боку, це також збільшує протизапальні цитокіни. Бета-ситостерин або пригнічує, або не пригнічує рівні IL-1 β і TNF- α шляхом підвищення поглинання кальцію в активованих нейтрофілах залежно від концентрації та часу через залежні від напруги кальцієві канали L-типу, внутрішньоклітинний кальцій, фосфоінозитид-кіназу-3 та модуляцію мікротрубочок [112]. Це посилює протизапальну функцію. Окрім цього, досліджено, що бета-ситостерин має протиартритну, жарознижуючу, протиракову, протидіабетичну, протимікробну та проти ВІЛ дії [57].

Даукостерин є фітостеролом і є продовженням ситостеролу, до якого залишок бета-D-глюкопіранозилу приєднаний у положенні 3' глікозидним зв'язком. За своїми терапевтичними властивостями подібний бета-

ситостерину. Даукостерол використовується як природний компонент хіміотерапевтичних препаратів, що застосовуються при лікуванні раку [113].

Терпеноїди відіграють важливу роль у боротьбі з грибковими патогенами та в наданні селективних переваг, наприклад, шляхом пригнічення росту сусідніх рослин або захисту від шкідників, патогенів і стресу. Вони також можуть відігравати тонкі фізіологічні ролі в рослинах, які ще не охарактеризовані [60].

Різні фармакологічні дії, такі як протипухлинна активність, пов'язані з наявністю гідроксильних груп у деяких пентациклічних тритерпеноїдах [47]. Рецемозол, полігідрокситритерпеноїд, продемонстрував значну протиракову активність проти раку печінки людини (HepG2), раку шийки матки людини (HT-3) і клітин нормальної карциноми людини (HeLa) [40, 63]. Крім того, тритерпеноїди тісно пов'язані з протизапальними властивостями. Він ефективно пригнічує активацію NF- κ B, індукує апоптоз і пригнічує запалення, тому відіграє вирішальну роль у протизапальних захворюваннях [60]. Припускають, що тритерпеноїди, які порушують і усувають шлях STAT3, основний внутрішній механізм запалення раку, відіграють значну роль у лікуванні раку молочної залози [66].

Урсолова кислота також є пентациклічним тритерпеноїдом, що утворюється з α -амірину, має численні фармакологічні властивості. Було досліджено, що урсолова кислота має антипротозойну дію, значною мірою пригнічує види *Leishmania*, найпростіші, відповідальні за тропічну хворобу лейшманіоз [53, 100].

Урсолова кислота виконує численні біологічні функції, включаючи антиоксидантну, протиракову, протизапальну [97, 99]. Останні дослідження вивчали вплив урсолової кислоти на розвиток неалкогольної жирової хвороби печінки. Аналіз *in vitro* та *in vivo* виявив зниження розміру печінки, рівнів АЛТ/АСТ у сироватці крові та пальмітинової кислоти, підвищення β -окислення ліпідів та зменшення стресу ендоплазматичного ретикулуму печінки [48].

Хімафілін (рис. 1.4) є представником 1,4-нафтохінонів. Це одна з основних БАР *C. umbellate*, отримана з різних видів *Chimaphilla* та *Pyrola*. У цих рослинах він утворюється за допомогою толугідрохінонового або толухінолового шляху).

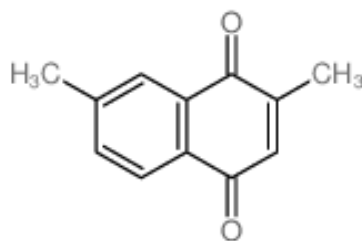


Рис. 1.4 Структурна формула хімафіліну (2,7-диметилнафталін-1,4-діон)

Встановлено, що хімафілін має протигрибкові властивості. Хімафілін перешкоджає клітинній стінці, транскрипції та мітохондріальним функціям. Результати також показали, що хімафілін має широкий спектр протигрибкової активності, яка включає дії проти грибкових патогенів у людей. Антиоксидантна активність екстракту *C. umbellate* здебільшого пов'язана з кверцетином і ізокверцетином, але хімафілін також може відігравати роль антиоксиданту, оскільки інші рослинні нафтохінони, такі як шиконін і плюмбагін, продемонстрували значну антиоксидантну активність [62].

Хімафілін пригнічує ріст ракових клітин. Авторами для визначення впливу *C. umbellate* на виживання клітин і утворення колоній у клітинах MCF-7, було проведено клоногенний аналіз.

Щоб перевірити дозозалежну ефективність, клітини обробляли різними концентраціями *C. umbellate*, тобто 40, 80 і 120 мкг/мл. Спостерігалось значне зниження виживаності клітин зі збільшенням дози.

При концентрації 80 мкг/мл спостерігалася значна загибель клітин приблизно на 65 % ($p < 0,05$). Однак максимальна загибель клітин (приблизно 85%) спостерігалася у відповідь на найвищу досліджувану концентрацію *C. umbellate* (120 мкг/мл). Для підтвердження наведених вище результатів було проведено аналіз МТТ залежно від дози та часу. Відповідно до результатів

клоногенного аналізу, спостерігалася посилена загибель клітин зі збільшенням концентрації використаних екстрактів. Приблизно 20, 70 і 85% загибелі клітин спостерігали при концентрації 40, 80 і 120 мкг/мл відповідно ($p < 0,05$) порівняно з клітинами, обробленими носієм (0,1% етанол). Подібним чином, залежний від часу аналіз проводили протягом 6, 12, 24 і 48 годин після обробки клітин єдиною концентрацією *C. umbellate* (80 мкг/мл).

Постійне зниження життєздатності клітин також спостерігалось з часом порівняно з клітинами, обробленими носієм. За добу життєздатність клітин знизилася приблизно на 75% ($p < 0,01$) порівняно з клітинами, обробленими носієм. Щоб перевірити вплив *C. umbellate* на нормальні клітини, було проведено порівняльну життєздатність клітин НЕК 293 (нормальні клітини) і MCF-7 (ракові клітини) залежно від дози і часу. Встановлено, що більше 75 % клітин були життєздатними в клітинах НЕК 293 проти 30 % життєздатності в клітинах MCF-7, коли їх обробляли препаратом. 80 мкг/мл CU протягом 24 год. Подібним чином спостерігалось значне зниження загибелі клітин MCF-7 після 24 год лікування *C. umbellate* (разова концентрація 80 мкг/мл) ($p < 0,05$). *C. umbellate* в обох клітинах MCF-7 і НЕК293 було виявлено 76,85 і 116,18 мкг/мл відповідно. Щоб перевірити вплив *C. umbellate* на загибель клітин у клітинних лініях раку молочної залози, відмінних від клітин MCF-7, аналогічний набір експериментів проводився на лінії клітин MDA-MB-231. Як і очікувалося, *C. umbellate* мала антипроліферативний ефект на клітини MDA-MB-231 залежно від дози, маючи значення IC 50 91,23 мкг/мл і значну загибель клітин у концентрації 80 мкг/мл. Це додатково підтвердило, що *C. umbellate* вибірково пригнічує проліферацію клітин раку молочної залози в певній концентрації, хоча й з різною ефективністю [62].

1.3 Фармакологічна властивості та застосування зимолюбки зонтичної

Засоби рослинного походження давно використовуються для лікування різноманітних захворювань людини та є цінним джерелом безпечних та

надзвичайно ефективних біологічно активних речовин [28, 125]. Трава зимолюбки сприяє виведенню азотистих і хлористих солей з організму, нормалізації травлення і підвищенню апетиту, а при діабеті – зниженню вмісту цукру в крові [27].

На фармацевтичному ринку України представлені засоби з трави зимолюбки зонтичної (рис. 1.5, рис. 1.6).



Рис. 1.5 Настойка зимолюбки зонтичної трави

Настойка зимолюбки зонтичної у гінекології застосовується для нормалізації менструального циклу, а також як кровоспинний засіб при маткових кровотечах. Також її використовують в якості супутнього лікування при опущенні матки. Зимолюбки зонтичну часто використовують у трав'яних зборах для лікування безпліддя, циститу та інших захворювань жіночої сечостатевої системи [38].

Настойка зимолюбки зонтичної має сечогінну та протизапальну дію. У народній медицині використовується при кашлі, задишці, туберкульозі легенів.

Настойка зимолюбки застосовується для лікування: подагри; набряків; туберкульозу; захворювань шкіри; гастриту; виразки шлунку; цукрового діабету; простатиту; хвороб суглобів; циститу [126]; захворювань печінки і нирок; депресії.

Спосіб застосування: настоянку зимолубки зонтичної пити по 30-40 крапель на півсклянки води 3 - 4 рази на день до їс. Курс 2 - 3 місяці.

Протипоказання: індивідуальна непереносимість, вагітність, лактація. З обережністю приймати при схильності до запорів і тромбоутворення.



Рис. 1.6 Зимолубки зонтичної трава висушена

Показання до застосування: пієліт, цистит; ревматизм; запалення передміхурової залози

У народній медицині траву вживають при пієліті, циститі, ревматизмі, запаленні передміхурової залози, набряках, як ранозагоюючий засіб. Зимолубка відома як засіб, що підвищує діурез, дезинфікує сечові шляхи, підвищує виділення з організму азотистих і хлористих солей, знижує вміст цукру в крові, збуджує апетит, покращує травлення, регулює менструації.

Настій трави вживають при хронічних захворюваннях нирок (альбумінурія, гематурія, нефрит) [116], при запальних процесах і піску в сечовому міхурі, хронічному гонорейному уретриті, звуженні уретри, при захворюваннях передміхурової залози, при набряках і водянці, захворюванні суглобів і подагрі, діабеті та диспепсії [127, 128]. Як в'язучий засіб настій п'ють при запаленнях шлунково-кишкового тракту та при катарі верхніх дихальних шляхів; як загальнозміцнюючий і тонізуючий засіб — при

внутрішніх захворюваннях, зумовлених надмірним фізичним навантаженням [124]. Місцево у вигляді настою або припарок з трави лікують хронічні хвороби шкіри, карциному, різні тверді пухлини. Відомі випадки успішного лікування раку молочної залози [37].

Способи приготування:

Настій трави. 20 г сировини заливають 200 мл окропу. Приймати по 1/3 склянки 3 рази на день.

Отже, засоби природного, зокрема, рослинного походження, є важливим джерелом нових лікарських засобів [118]. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) заохочує використання лікарських трав як засобів, що застосовуються у комплексній терапії традиційного лікування [4].

Тому проведення досліджень з розширення відомостей про хімічний склад рослини та вивчення її фармакологічних властивостей у напрямку лікування захворювань нирок та сечовивідних шляхів є актуальним напрямом на сьогодні.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика об'єктів дослідження

Об'єктами дослідження були:

- трава зимолубки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* L.), виробник ТОВ «Світ трав» м. Харків (<https://mir-trav.com.ua/ua/>). На рис. 2.1 зображена трава зимолубки у свіжому на висушеному вигляді.



Рис. 2.1 Зовнішній вигляд трави зимолубки зонтичної: 1 – свіжа сировина, 2 – висушена сировина

Листки вічнозелені, короткочерешкові, цупкі, шкірясті, блискучі, видовженооберненоклиновидні, по краю пилчастозазублені, зближені в кільця. Квітки — середнього розміру, правильні, двостатеві, 5-пелюсткові, рожеві, зібрані на верхівці стебла в зонтиковидну китицю.

- субстанції з вищенаведеної ЛРС: водний екстракт (1:10); етанольні екстракти (1:5) 50 %, 70 %;
- готові форми: таблетки з екстрактом зимолубки зонтичної.

2.2 Відомості про прилади, методи і реактиви

Дослідження з визначення показників якості трави зимолюбки зонтичної проводили за методиками, наведеними у ДФУ [10, 11]: втрата в масі при висушуванні (ДФУ 1.2 п. 2.2.32), зола загальна (ДФУ п. 2.4.6), зола, не розчинна в кислоті хлористоводневій (ДФУ 1.2 п. 2.8.1), сторонні домішки (ДФУ 1.2 п. 2.8.2), важкі метали (ДФУ п. 2.4.27).

Визначення технологічних параметрів ЛРС (об'ємна маса, насипна маса, питома маса, пористість, нарізність, вільний об'єм шару) проводили за методиками [10].

Для зважування випробуваних зразків використовували електронні аналітичні терези «Mettler-Toledo AB-204/A» (Німеччина). Для висушування ЛРС та сухих екстрактів використовували сушильну шафу «2Ш-0-01». Для спалювання ЛРС використовували муфельну піч «Електропіч опору камерна лабораторна». При проведенні досліджень використовували мірний посуд «Simax» класу А, аналітичні ваги ABJ 220-4М «KERN», водяна баня HWS12 «ULAB», етанол 96 %, цинковий порошок, хлористоводнева кислота і оцтова кислота льодяна, що відповідають вимогам ДФУ. Всі реактиви для досліджень готували відповідно до вимог ДФУ [12].

Мікроскопічні дослідження проводили відповідно до класичних методик [15; 41]. Для виготовлення мікропрепаратів брали попередньо-розмочену у воді суху сировину трави зимолюбки зонтичної. Фрагмент органу рослини проварювали у 5% розчині NaOH протягом 3-5 хвилин для мацерації клітин та легкого відокремлення епідерми від мезофілу. З метою просвітлення об'єктів їх проварювали у водному розчині хлоралгідрату (4:1). Приготовлені мікропрепарати досліджували у водному середовищі та водних розчинах гліцерину різної концентрації під мікроскопом за допомогою мікроскопа фірми ULAB (збільшення $\times 40$, $\times 100$, $\times 1000$) з цифровою мікрофотокамерою Canon EOS 550. Для забезпечення об'єктивних результатів кожен зразок вивчався в десятикратній повторюваності.

Продиховий індекс обчислювали згідно зі стандартною методикою, яка наведена у Державній фармакопеї України.

2.3 Методики дослідження якісного складу та визначення вмісту біологічно активних речовин у траві зимоліубки зонтичної

1. Ідентифікація фенольних сполук методом високоефективної тонкошарової хроматографії. Визначення методом ВЕТШХ проводили за допомогою приладу CAMAG, що складається з напівавтоматичного пробовідбірника Linomat 5, камери автоматичного проявлення 2 (ADC2), нагрівача пластини TLC III і візуалізатора ТШХ, з'єднаного з програмним забезпеченням visionCATS 2.1. Використовували пластини ВЕШХ силікагель Si 60 F254, 20x10 cm (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина).

В якості рухомої фази використовували: етилацетат – мурашину кислоту – воду очищену 68:8:8, виявлення хроматографічних зон проводили, використовуючи специфічний реагент – аміностиловий ефір дифенілборної кислоти Р та макрогол. Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм, 365 нм та при денному світлі до та після дериватизації.

Порошкоподібний рослинний матеріал (50 мг) екстрагували окремо 50 %, 100 % (об./об.) метанолом та ацетоном (1:10) на ультразвуковій водяній бані протягом 20 хв при 30 °С. Екстракт фільтрували за допомогою фільтра Millex R Syringe 0,45 мкм. Еталонні зразки хлорогенової кислоти, кавової кислоти, гіперозиду, рутину, кверцетину, авікуляріну, ізокверцетину, галової кислоти окремо розчиняли в метанолі з концентрацією 1 мг/мл, потім обробляли ультразвуком протягом 10 хвилин при 30 °С.

Зразки наносили на пластину у вигляді смуг шириною 8 мм за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 зі шприцом на 100 мкл. Відстань між лініями становила 2,0 мм, а швидкість нанесення становила 90 нл·с⁻¹. Застосовували 2 мкл для стандартів речовин та 7 мкл розчинів зразків.

Планшети проявляли в ADC 2 з насиченням камери (фільтровим папером) протягом 20 хв і після активації при відносній вологості 33 % протягом 10 хв з використанням насиченого розчину хлориду магнію, проявлення етилацетатом – мурашиною кислотою – водою 68:8:8 (V/V) до відстані міграції 70 мм (від нижнього краю) з подальшим висушуванням протягом 5 хв.

Пластини обробляли шляхом занурення у розчин А (2 г 2-аміноетейлдіфенілборинат у 200 мл метанолу), а потім у PEG400 (макрогол 400; 10 г поліетиленгліколю 400 у 200 мл дихлорметану), потім нагрівали при 100°C протягом 5 хв. Пластини візуалізували за допомогою CAMAG Visualizer під білим світлом, УФ 254 нм і при УФ 366 нм, фотографували а аналізували за допомогою програмного забезпечення (VisionCats) [110].

2. Кількісне визначення фенольних сполук методом ВЕРХ. Хроматографічне розділення фенольних сполук у траві зимолубки проводили за допомогою системи Waters e2695 Alliance HPLC у поєднанні з детектором 2998 PDA (Waters, Milford, MA, USA). Фенольні сполуки розділяли на колонці ACE Super C18 (250 мм × 4,6 мм, з розміром часток 3 мкм) (ACT, Aberdeen, UK). Температура колонки становила 25°C. Рухома фаза складалася з двох розчинів: 0,1 % водного розчину трифтороцтової кислоти (рухома фаза А) та ацетонітрилу Р (рухома фаза Б). Режим градієнтного елюювання був наступним: 0 хв, 5% В; 8–30 хв, 20% В; 30–48 хв, 40% В; 48–58 хв, 50% В; 58–65 хв, 50% В; 65–66 хв, 95% В; 66–70 хв, 95% В; 70–81 хв, 5% В. Об'єм інжекцій випробовуваного розчину (розчину порівняння) складав 10 мкл, швидкість потоку становила 1000 мл/хв, температура колонки – 25 °С. Детектування речовин відбувалося шляхом порівняння УФ-видимого спектру кожного піку з дійсними еталонними стандартами та вимірювання їх часу утримання. Кількісне визначення речовин було розраховане за допомогою градувальних графіків. Валідаційні характеристики метода ВЕРХ проведені згідно з рекомендаціями ICH Q2 (R1) та включали лінійні калібрувальні криві

($r > 0,999$), межі виявлення (LOD) і кількісного визначення (LOQ), прецизійність, специфічність. При проведенні кількісного визначення метаболітів зимолюбки, кожен зразок аналізували двічі, і для розрахунку використовували середнє значення [110].

3. Кількісне визначення амінокислот методом ГХ-МС. Приготування розчинів для аналізу амінокислот у сировині: 0,2 г, відважували в мірну колбу та екстрагували метанолом (10 мл) в УЗ-бані при кімнатній температурі (20 ± 2 °C) протягом 15 хв. Отриманий розчин центрифугували 10 хв при 5000 об/хв при 25 °C. Кількість 500 мкл супернатанту випарювали під газоподібним азотом до сухого залишку. Отриманий осад розчиняли в 100 мкл ацетонітрилу та 100 мкл MTBSTFA. Цей розчин нагрівали при 100°C протягом 2,5 год на гліцериновій бані. Потім 1 мкл досліджуваного розчину вводили в газовий хроматограф.

Приготування стандартних розчинів амінокислот. 100 мкл стандартної суміші L-амінокислот (Sigma-Aldrich, Литва) відбирали та сушили під газоподібний азот до сухого залишку, потім додавали 100 мкл ацетонітрилу та 100 мкл MTBSTFA. Отриманий розчин нагрівали при 100 °C протягом 2,5 год на гліцериновій бані.

Для аналізу використовували стандартні суміші L-амінокислот: аланін, серин, валін, треонін, лейцин, ізолейцин, пролін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, метіонін, фенілаланін і тирозин (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Німеччина).

Наступні реагенти використовували для ГХ-МС аналізу: ацетонітрил (Sigma-Aldrich GmbH, Карлсруе, Німеччина), N-трет-бутилдиметилсиліл-N-метилтрифторацетамід з 1% трет-бутилдиметилхлорсилану (MTBSTFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), метанол (34860, Sigma-Aldrich, Німеччина), очищена вода (Millipore, Bedford, MA). Усі реактиви були від класи «хімічно чистий» і «хімічно чистий для аналізу».

Умови ГХ-МС аналізу амінокислот. Температуру колонки становила 75°C і її підтримували протягом 5 хв, а потім підвищували на 10°C/хв до 290 °C, потім на 20°C/хв до 320°C і, витримували при цій температурі 5 хв. Ін'єкцію проводили в режимі спліттер 1:20 при 260 °C з об'ємом ін'єкції 1 мкл. Швидкість потоку колонки становила 1,5 мл/хв, тиск 100 кПа, загальна швидкість потоку: 34,4 мл/хв. Загальна тривалість аналізу – 41 хв.

0,1 мл досліджуваного екстракту упарюють насуху в потоці газоподібного азоту. Висушений зразок розбавляли ацетонітрилом (0,1 мл) і агентом MTBSTFA (0,1 мл). Розчин ретельно перемішували на вортекс-міксері протягом 1 хв та інкубували при 100°C у гліцериновій бані протягом 2,5 годин. Кожен отриманий розчин аналізували ГХ аналізом у трьох повторях.

Для аналізу використовували хроматографічну систему SHIMADZU GC-MS-QP2010, з'єднану з джерелом іонів електронної іонізації та одноквадрупольним MS 5975C (Shimadzu Technologies). Було використано роботизований автоматичний пробовідбірник і розділений/нерозділений ін'єкційний порт. Розділення амінокислот проводили в Rxi-5 мс (капілярна колонка Restek Corporation (довжина 30 м, зовнішній діаметр 0,25 мм і товщина рідини–стаціонарна фаза 0,25 мкм) з рідкою нерухомою фазою 5% дифенілу та 95% полісилоксану) з гелієм при чистоті 99,99% як газ-носії при постійному потоці 1,47 мл/хв. Температуру духовки було запрограмовано на 75°C протягом 1 хв, потім її підвищили до 290°C зі швидкістю 10°C/хв та підтримували протягом 5 хв, а потім підвищили до 320°C зі швидкістю 20°C/хв та підтримували протягом 10 хв. Температуру інжектора та детектора підтримували на рівні 260°C та 280°C відповідно. Діапазон концентрацій стандартів був від 0,1 до 100 нг/мл. МС працювала в позитивному режимі (енергія електронів 70 eV). Повне сканування було виконано з діапазоном визначення маси, встановленим на 35–500 m/z, щоб визначити час утримування аналітів, оптимізувати температурний градієнт печі та спостерігати характерні масові фрагменти для кожного аналіту. Збір та аналіз

даних виконували G1701EA GC-MDS ChemStation (версія E.02.02.1431) (Agilent Technologies).

Амінокислоти ідентифікували шляхом порівняння мас-спектрів сполук з даними бібліотек NIST14 і WRT10, а для ідентифікації та кількісного визначення амінокислот використовували суміш стандартних зразків [64].

4. Визначення кількісного вмісту макро- та мікроелементів методом атомно-емісійної спектрографії. Експеримент проводився на базі відділу аналітичної хімії функціональних матеріалів та об'єктів навколишнього середовища ім. А.Б. Бланка ДНУ НТК «Інститут монокристалів» НАН України.

Проби випарювали з кратерів графітових електродів у розряді дуги змінного струму силою 16 А при експозиції 60 с. Як джерело збудження спектрів було використано ІВС-28. Спектри реєстрували на фотоплівці за допомогою спектрографа ДФС-8 з дифракційною решіткою 600 штр/мм та трилінзовою системою освітлення щілини.

Градувальні графіки в інтервалі вимірюваних концентрацій елементів будували за допомогою стандартних проб розчинів солей металів (ICORM-23-27). Для розчинення міді та ванадію використовували кислоту нітратну, а при аналізі інших елементів – реактиви кваліфікації х.ч. та двічі очищену воду. Фотометрували лінії спектрів при довжині хвилі від 240 до 347 нм у пробах у порівнянні з державними зразками суміші мінеральних елементів, що відповідають складу різнотрав'я, за допомогою мікрофотометра МФ-4. Відносне стандартне відхилення (для п'яти паралельних вимірів) не перевищувало 30 % при визначенні чисельних величин концентрацій елементів [29].

5. Кількісне визначення речовин, що переганяються з водяною парою. Кількісне визначення речовин, що переганяються з водяною парою, проводили методом газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ-МС), який

дозволяє провести ідентифікацію і кількісне визначення досліджуваних сполук без використання мітчиків цих речовин за бібліотечними мас-спектрами.

Наважку досліджуваного зразка (50-100 мг, точна наважка) вміщували у віалу на 2 мл, додавали 1 мл хлористого метилену та внутрішній стандарт (тридекан), з розрахунку 50 мкг на наважку, з подальшим визначенням отриманої концентрації внутрішнього стандарту, яка використовується для остаточних розрахунків. Екстракцію проводили протягом 24 год, після чого розчинник кількісно переносили у віалу на 2 мл і упарювали до об'єму 50 мкл.

Введення проби (1 мкл) у хроматографічну колонку проводили без ділення потоку, що дозволяє ввести пробу без втрат на розділення та суттєво (у 10-20 разів) збільшує чуттєвість методу хроматографування.

Умови проведення аналізу: хроматограф Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973; хроматографічна колонка – капілярна з внутрішнім діаметром 0,25 мм і завдовжки 30 м; швидкість газу-носія (гелій) – 1,2 мл/хв; температура нагрівача введення проби – 250 °C; температура термостата програмується від 50 °C до 320 °C із швидкістю 4 °C/хв; швидкість введення проби 1,2 мл/хв протягом 0,2 хв.

Розрахунок вмісту компонентів проводили за формулами:

$$C = K_1 \cdot K_2 \cdot 1000, \text{ мг/кг}$$

$$\text{де } K_1 = \frac{P_1}{P_2}$$

$$K_2 = \frac{50}{M}$$

P_1 – площа піку досліджуваної 50 – маса внутрішнього стандарту, речовини; введеного у зразок, мкг;

P_2 – площа піку стандарту M – маса наважки зразка, мг

Для ідентифікації компонентів використовувалася бібліотека мас-спектрів Nist05 і WILLEY 2007, із загальною кількістю спектрів більше 470 тис., спільно з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST.

2.4 Дослідження фармакологічних властивостей екстракту зимолюбки трави

1. Дослідження впливу екстракту трави зимолюбки на клітинні культури. Клітинну лінію L929 (фібробласти жирової тканини миші) отримано в низькотемпературному банку Інституту проблем Кріобіології та кріомедицини НАН України. Клітини культивували у середовищі DMEM (Bio West, Франція) збагаченому 10 % FBS (Lonza, Німеччина) з 1 % антибіотику-антимікотику (Bio West, Франція), у CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері з 5 % CO₂.

Для вивчення форми клітин, конфлюентності моношару клітини сіяли на 24 лункових планшетах (SPL, Республіка Корея) у концентрації $1 \times 10^5 / \text{см}^2$, через 24 год додавали досліджувану речовину, ще через 24 год проводили оцінювання [79, 81].

Для оцінки проліферації клітини сіяли на 24 лункові планшети 1×10^5 лунку, через 24 год додавали досліджувану речовину, ще через 72 год (96 год від посіву, 72 год впливу) клітини знімали трипсином з ЕТДА перераховували за допомогою онлайн сервісу <https://www.doubling-time.com/compute.php> [55, 84].

Для оцінки міграційної здібності клітин методом скретч тесту клітини сіяли на 24 лункові планшети 1×10^5 лунку, через 24 год робили дефект наконечником піпетки 200 мкл, додавали досліджувану речовину, ще через 24 год (48 год від посіву, 48 год впливу), вимірювали ширину дефекту через рівні проміжки від стінки до стіни лунки [51, 82].

Метаболічну активність клітин оцінювали методом МТТ тесту. Для цього клітини пересівали на 96 лунковий планшет (SPL, Корея) у концентрації 2×10^4 на лунку, дослідження проводили наступного дня після пересіву, після адгезії та формування моношару. Додавали досліджувану речовину на 1 добу. Культивували протягом 24 год у CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в атмосфері з 5 % CO₂. Як контроль використовували клітини

без речовини і клітини вбиті 70 % етанолом. Після чого середовище відбирали, додавали 0,1 мл середовища культивування з 15 мкл МТТ в концентрації 5 мг/мл, інкубували 3 години в CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Після чого відбирали середовище, додавали по 0,1 мл DMSO з SDS інкубували 1 год при 37 °С. Адсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі SM600 (Utrao, Китай), при довжині хвилі 570 нм [32, 80].

Піноцитозну активність визначали методом поглинання нейтрального червоного. Для цього клітини пересівали на 96 лунковий планшет (SPL, Корея) у концентрації 2×10^4 на лунку, дослідження проводили наступного дня після пересіву, після адгезії та формування моношару. Додавали досліджувану речовину на 1 добу. Культивували протягом 24 год у CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂. Як контроль використовували клітини без речовини і клітини вбиті 70% етанолом. Після чого середовище відбирали, додавали 0,1 мл 50% етанолу з 3% уксусної кислоти. Адсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі SM600 (Utrao, Китай), при довжині хвилі 540 нм.

Для візуалізації використовували мікроскоп DeltaOptical NIB 100 (Польща), камеру Sigeta MCMOS 3100 3.1MP (Китай). Для обробки зображення використовували програмне забезпечення ToupView V 3.7. (Hangzhou Toup Tek Photonics Co., Ltd, Hangzhou, China). Для оцінки достовірності різниці між групами порівняння застосовували U-критерій Мана-Уїтні, критерій Краскела-Уолліса. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували програмне забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway) [32, 92].

2. Дослідження *in vitro* антиоксидантної активності методом ВЕРХ. Використовували хроматограф Waters 2695 (фірма «Вотерс», США) оснащений Waters 996 діодно-матричним детектором. рухому фазу переносили в реакційну петлю з реагентом ABTS, який подавався насосом

Gilson 305. Реакційна петля була виготовлена з тефлону, мала довжину 3 м і внутрішній діаметр 0,25 мм. Параметри системи з розчином ABTS встановили таким чином: температура -50°C , швидкість потоку реагенту $-0,5$ мл/хв. Умови приготування систем описано у працях [110].

3. Визначення нефропротекторної дії екстракту трави зимоліубки зонтичної. Дослідження виконано на 60 аутобредних статевозрілих щурах (самцях), масою 250 ± 20 г, що утримувалися в віварію навчально-наукової тренінгової лабораторії медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету (ННТЦ МБД НФаУ). Тварин утримували в окремій кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату: температура повітря $18-22^{\circ}\text{C}$, відносна вологість повітря 50-65%, світловий режим «12 годин день/ніч», в пластикових клітках із індивідуальною вентиляцією [33]. Стерилізацію приміщення за допомогою УФ-лампи здійснювали щоденно. Тварини мали вільний доступ до води (попередньо відстояна водопровідна вода з напувалок). Для годування тварин використовували гранульовані збалансовані комбікорми (ТУ.У15.7-2123600159-001:2007). Догляд за тваринами проводили відповідно до стандартних операційних процедур ННТЦ МБД НФаУ. Всі етапи дослідження проведені згідно Директиви Європейського Парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» [14; 70].

Перед проведенням експерименту тварини пройшли акліматизацію протягом 7 діб. Протягом періоду акліматизації проводили щоденний огляд кожної тварини (оцінювали поведінку та загальний фізичний стан), спостерігали за тваринами для виявлення можливих випадків захворюваності або смертності. Перед початком експерименту кожного щура поміщали на 3 години в метаболічну клітку для акліматизації [33].

В ході даного експерименту проводили вивчення активності різних рівнів доз екстракту трави зимоліубки зонтичної на моделі хронічної хвороби

нирок у порівнянні з компаратором – препаратом "Леспефрил" виробництва ПАТ "Лубнифарм" (Україна), розчин для орального застосування у флаконах по 100 мл, що містить екстракт леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor*) із 70,8 г пагонів [17].

Після акліматизації піддослідних тварин рівномірно розподілили на 6 експериментальних груп по 10 тварин у кожній за наступним дизайном:

- 1) Негативний контроль (НК) – група умовноздорових тварин, яким не відтворювали модельну патологію.
- 2) Позитивний контроль (ПК) – група експериментальних тварин, яким відтворювали хронічну ниркову недостатність, лікування не проводили.
- 3) Референтна група (РЗ) – група експериментальних тварин, яким відтворювали хронічну ниркову недостатність та проводили лікування препаратом "Леспефрил" у добовій дозі 3,0 мл/кг (референс-контроль).
- 4) Тестова група №1 (ТЗ-1) – група експериментальних тварин, яким відтворювали хронічну ниркову недостатність та проводили лікування екстрактом зимолоубки зонтичної у добовій дозі 0,5 мл/кг.
- 5) Тестова група №2 (ТЗ-2) – група експериментальних тварин, яким відтворювали хронічну ниркову недостатність та проводили лікування екстрактом зимолоубки зонтичної у добовій дозі 1,5 мл/кг.
- 6) Тестова група №3 (ТЗ-3) – група експериментальних тварин, яким відтворювали хронічну ниркову недостатність та проводили лікування екстрактом зимолоубки зонтичної у добовій дозі 3,0 мл/кг.

Добові дози тест-зразка були обрані емпіричним шляхом відповідно результатам попередніх скринінгових досліджень з передбаченням встановлення ефективної дози в даному експерименті; добова доза референтного зразка для експериментальних тварин була обчислена із урахуванням міжвидової різниці маси та площі поверхні тіла відповідно до загально використаних рекомендацій FDA [122].

Модель хронічної хвороби нирок у щурів відтворювали за рахунок одноразової підшкірної ін'єкції 2,5 % розчину хромату калію в дозі 0,7 мл/кг

[31; 119]. Після чого розпочинали щоденне уведення тестових та референтного зразків протягом 20 діб. Введення зразків виконували внутрішньошлунково натще 1 раз на добу за допомогою спеціального металевого зонду для інтрагастрального введення. Тварини групи НК отримували відповідну кількість води очищеної. На 19 добу спостереження тварин поміщали до метаболічних кліток на 24 години та визначали спонтанний добовий діурез й збирали зразки добової сечі [71]. На 20 добу проводили евтаназію тварин гуманним методом в CO₂-камері, кров для отримання сироватки забирали у тварин з нижньої порожнистої вени, робили розтин та вилучали нирки для визначення масових коефіцієнтів. Враховуючи високий показник летальності даної моделі в процесі спостереження також реєстрували виживаність тварин.

В зразках сироватки крові та сечі визначали сечовини й креатинін, додатково визначали загальний білок в сечі. Біохімічний аналіз проводили за допомогою стандартних наборів реагентів «Креатинін HP014.01», «Сечовина-У HP018.02», «Загальний білок УЛ HP010.02» (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна) згідно відповідних інструкцій з використання на спектрофотометрі LabAnalyt SP-V1000 (Granum, Китай). На основі результатів біохімічних досліджень розраховували кліренс креатиніну та кліренс сечовини у піддослідних тварин [58; 101].

Отримані результати виражали у вигляді середнього арифметичного значення (M) та стандартної помилки середнього (SEM). Порівняння експериментальних груп проводили за допомогою параметричних методів аналізу (ANOVA, Tukey HSD test). Показники, що виражалися у відсотках порівнювали за допомогою кутового перетворення Фішера. Вірогідність відмінностей визначали за рівнем значущості $P < 0,05$. Статистична обробка проведена із використанням базового пакету програм MS Excel 2007 та IBM SPSS Statistics 22 [83]. Використовували методи (прийоми) визначення узагальнюючих зведених показників.

4. Визначення впливу екстракту трави зимоліюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок щурів. Для визначення впливу екстракту трави зимоліюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок щурів досліджено нирки щурів після:

- одноразового підшкірного введення 2,5 % розчину хромату калію дозою 0,7 мл/кг у перший день експерименту – контрольна патологія;
- введення етанольного екстракту трави зимоліюбки зонтичної (Е33) дозою 3 мл/кг або референс-препарату розчину леспефрину дозою 3 мл/кг починаючи з другого дня експерименту (після індукції ниркової недостатності) щоденно протягом 20 днів у вигляді водних розчинів, виготовлених на фізіологічному розчині.
- інтактних щурів, які отримували еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Проводили дослідження на статевозрілих щурах (самцях). Тварин утримували в окремій кімнаті з контрольованими параметрами мікроклімату, в пластикових клітках із індивідуальною вентиляцією. Щоденно здійснювали стерилізацію приміщення за допомогою УФ-лампи. Тварини мали вільний доступ до води. Для годування тварин використовували гранульовані збалансовані комбікорми.

Дослідження проведено відповідно до закону України «Про лікарські засоби» та згідно з вимогами ДЕК МОЗ України щодо доклінічних досліджень з урахуванням положень Директиви Європейського Парламенту та Ради ЄС 86/609/ЄС від 24 листопада 1986 р. «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети», Директиви Європейського Парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (Протокол Комісії з біоетики НФаУ № 9 від 03.05.2023 р.) [72, 114].

Виведення з експерименту проводили через 20 днів після початку лікування. Зразки нирок фіксували у 10 % розчині формаліну, зневоднювали у

спиртах зростаючої міцності, заливали у парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, становили ШІК-реакцію [72]. Проводили напівкількісну (бальну) оцінку ушкодження ниркових тілець і кіркових каналців. При оцінці стану ниркових тілець використовували такі морфологічні показники: ступень розширення капсули Шумлянського-Боумена, мезангіуму; сегментарну інтракапілярну проліферацію (0 – нема змін; 1б – слабкі зміни; 2б – помірні зміни; 3б – виразні зміни) - у 10 ниркових тільцях у кожного дослідженого щура. Результати по кожному тільцю підсумовувалися, виводили середній показник по 10 тільцям [102; 121]. Ушкодження каналців оцінювали у 5 п/з кіркового шару і кортико-медулярної зони, що не перекривалися. Оцінювали ступень виразності атрофії, набрякості, вакуольної дистрофії та дезорганізації нефротелію, тубулогідрозу: 0 – немає змін; 1б – ушкодження до 10% каналців; 2б – ушкодження до 25% каналців; 3б – ушкодження до 50% каналців; 4б – ушкодження до 75% каналців; 5б – ушкодження понад 75% каналців. Результати вимірів підсумовувалися по кожному п/з, виводили середній показник [50].

Мікропрепарати нирок досліджені під світловим мікроскопом Granum («Granum», Китай), мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровою відеокамерою Granum DCM 310 («Granum», Китай). Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Levenhuk 310 Tour View.

Цифрові дані обробляли статистично. Стандартне відхилення /медіана та верхній і нижній квартилі, мінімальне та максимальне значення. Для проведення вибірок використані непараметричні методи (Крускала-Уолліса та критерій Манна-Вітні).

5. Визначення протизапальної дії екстракту трави зимолубки зонтичної.

В ході даного експерименту проводили скринінг протизапальної активності для наступних тестових зразків:

- Етанольний екстракт (50 %) трави зимолюбки зонтичної – 1:5 (CE5);
- Етанольний екстракт (70 %) трави зимолюбки зонтичної – 1:5 (CE7);
- Водний екстракт трави зимолюбки зонтичної – 1:10 (BE).

Щурів самців з вагою 160-180 г розподілили на 10 груп по 6 тварин в кожній. Відповідно перша група негативного контролю (НК), і решта дев'ять – експериментальні, по 3 рівні доз для кожного з тест зразків. Кожний тест-зразок вивчався в дозах 0,5 мл/кг, 0,75 мл/кг та 1 мл/кг. Досліджувані зразки вводили одноразово в день експерименту за 1 годину до введення флогогену, внутрішньошлунково у вигляді розчину у воді очищеній за допомогою зонду. Індивідуальні дози були розчинені у воді очищеній таким чином, щоб ввести 6 мл/кг рідини. Тварини групи негативного контролю отримували лише воду очищену без розчинених в ній тест-зразків.

Гостре ексудативне запалення викликали субплантарним уведенням 1% розчину карагеніну («Sigma-Aldrich», США у задню праву кінцівку по 0,1 мл кожній тварині [14; 73]. Ефективність застосування зразків оцінювали за пригніченням розвитку набряку кінцівки. Об'єм набряку вимірювали в динаміці через 1, 2 та 3 години після введення флогогену з використанням цифрового плетизмометра (PanLabLE7500, Spain) та відображували у см³.

Отримані результати виражали у вигляді середнього арифметичного значення (M) та стандартної помилки середнього (SEM). Порівняння експериментальних груп проводили за допомогою параметричних методів аналізу (ANOVA, Tukey HSD test). Вірогідність відмінностей визначали за рівнем значущості $P < 0,05$. Статистична обробка проведена із використанням базового пакету програм MS Excel 2007 та IBM SPSS Statistics 22 [83].

6. Визначення антимікробної дії екстракту трави зимолюбки зонтичної. Дослідження антимікробної дії проводили на базі ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова" під керівництвом завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології к.біол.н., ст.н.с. Осолодченко Т.П.

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів до екстракту зимолобки проводили у відповідності до методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05.04.2007 р. № 167) [42] методом колодязів на середовищі Мюллера-Хінтона («HimediaLaboratorlesPvt. LtdIndia»), яке готували відповідно до інструкції виробника.

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Використовували прилад Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією до приладу та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 “Стандартизація приготування мікробних суспензій”, м. Київ. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4 °C). Чутливість грибів визначали на середовищі Сабуро. Визначення чутливості дослідних речовин проводили на двох шарах поживного середовища, які розливали у чашки Петрі. Нижчий шар складався з агар-агару (10 мл). На нього встановлювали 3-6 металеві стерильні циліндри діаметром 8 мм та висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар (14 мл поживного середовища + 1 мл мікробного розчину 0,5 од за шкалою McFarland), який складався з поживної агарізованого середовища з відповідним стандартом добової культури мікроорганізма. Після застигання стерильним пінцетом виймають колодязі і в лунки вносять дослідну речовину (0,3 мл). Оцінку антибактеріальної активності дослідних речовин проводили за діаметром зон затримки росту [4; 19].

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ, ВСТАНОВЛЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТРАВИ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ

3.1 Дослідження якісного складу та кількісного вмісту фенольних сполук у траві зимолюбки зонтичної

Існують різні методи якісного та кількісного визначення фенольних сполук у лікарській рослинній сировині: хроматографічні (ПХ, ТШХ, ВТШХ, ВЕРХ), спектроскопічні (спектрофотометрія, фотоколориметрія) [5; 67; 103].

Сучасний метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) широко використовується для фармакопейного аналізу лікарської рослинної сировини [13]. Це дає можливість порівнювати результати різних видів або екстракції паралельно на одній пластині або порівнювати треки з різних пластин за допомогою «віртуальної пластини». Крім того, результати можуть зберігатися у традиційній формі зображення (хроматограма) або як профілі піків із зображення/денситограми. Таким чином, даний метод є корисним інструментом для проведення не тільки якісного, але також специфічного та неспецифічного якісного та кількісного визначення [110].

Ідентифікацію фенольних сполук та флавоноїдів у метанольних та ацетонових екстрактах сировини проводили за допомогою модифікованої фармакопейної методики тонкошарової хроматографії, яка використовується у монографіях ДФУ для ідентифікації фенольних сполук у ЛРС [11]. Отримані хроматограми наведені на рис. 3.1.

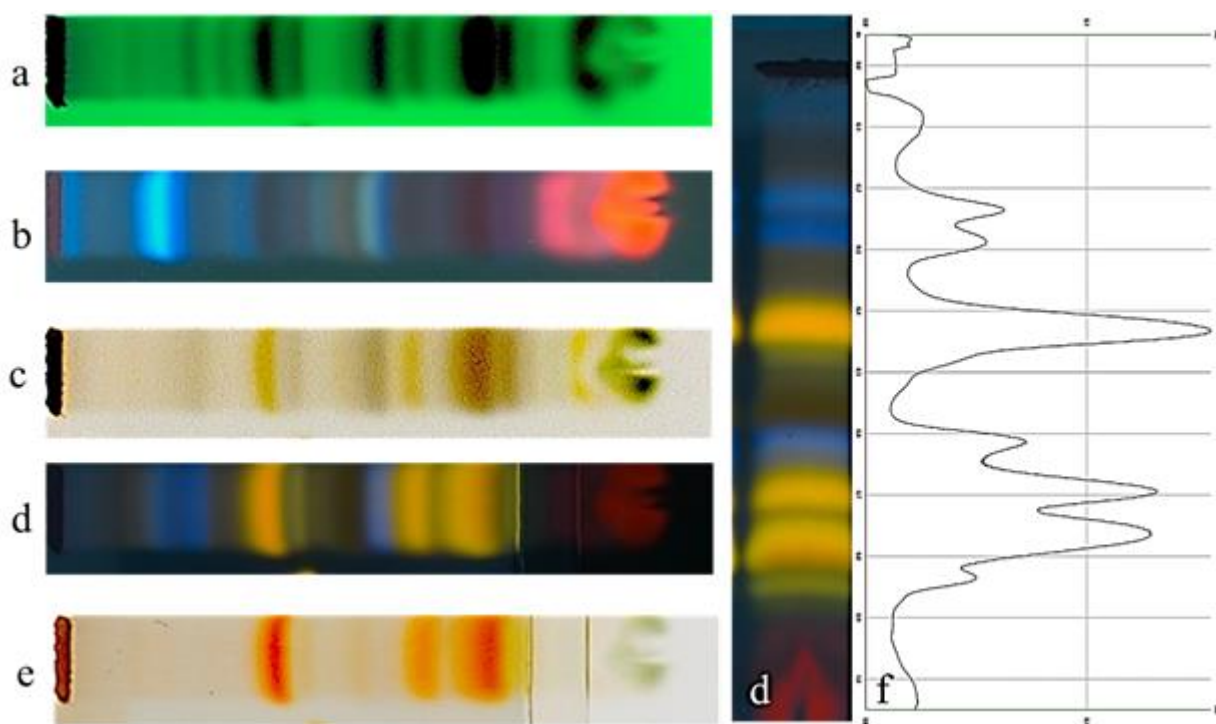


Рис. 3.1 ВЕТШХ зони метанольного екстракту зимоліюбки за довжини хвилі 254 нм (a), 365 нм (b) та при денному світлі (c) до дериватизації та за довжини хвилі 365 нм (d) та при денному світлі (e) після дериватизації та профіль денситометричного сканування (f) зон при 365 нм. Система: етилацетат – мурашина кислота – вода (68:8:8) (V/V); дериватизація аміноетиловим ефіром дифенілборної кислоти з наступною обробкою макроголом 400 і нагріванням при 105°C 5 хв

Для обрання оптимального розчинника для екстракції проводили порівняння результатів хроматографічного аналізу у 50% метанольному, 100% метанольному та екстрактів з ацетону. У результаті аналізу хроматографічних профілей, отриманих зі зразків сировини, ідентифіковані зони на рівні гіперозиду, авікулярину та ізокверцетину у порівнянні із зонами стандартних зразків (рис. 3.2). Інтенсивність забарвлення ідентифікованих зон відповідних сполук відмічалася приблизно однакова, але у екстракті отриманому 100% метанолом, поділ зон був чітким, не відбувалась інтенсивна екстракція хлорофілів, які заважали розділенню зон. В результаті, 100% метанол було

обрано як оптимальний розчинник для вилучення фенольних речовин зимолюбки.

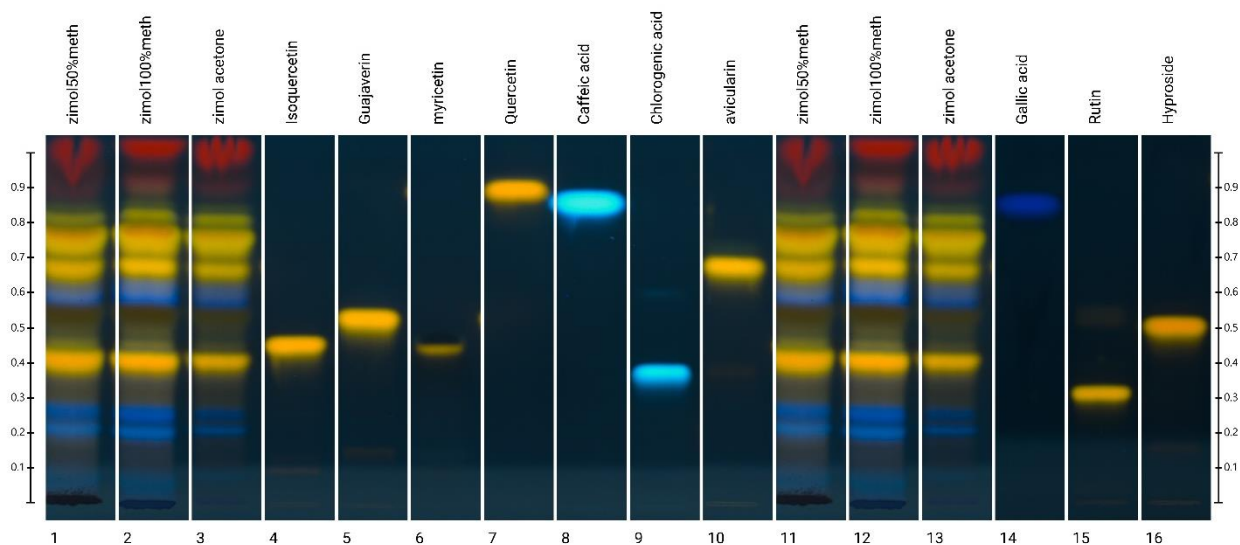


Рис. 3.2 Профіль ВЕТШХ зразків зимолюбки (50%, 100% метанол та ацетон) і стандартів при УФ 366 нм після дериватизації

Порівняння зон у траві зимолюбки із зонами стандартів, дозволило припустити наявність гіперозиду (R_f 0.41), авікулярину (R_f 0.67), ізокверцетину (R_f 0.45), галової (R_f 0.81), кофейної кислот (R_f 0.87) у досліджуваній сировині (рис. 3.3).

Відповідно до проведеного літературного огляду вітчизняних та іноземних джерел наукової літератури, наразі відсутні наукові публікації аналізу біологічно активних сполук зимолюбки хроматографічними методами. Тільки в оглядовій статті [59] наводиться інформація про присутність у листі і квітів зимолюбки флавоноїдів, серед яких гіперозид, кемпферол і авікулярин є домінуючими.

Визначення кількісного вмісту фенольних сполук проводили методом високоефективної рідинної хроматографії. Одержання екстрактів для хроматографічних досліджень. Подрібнену до частинок розміром 2–3 мм наважку рослинної сировини (0,2 г) екстрагували 10 мл 50% (об'єм/об'єм)

метанолу, води очищеної та 100 % метанолом. в ультразвуковій ванні (WiseClean) при 45 ± 2 °C протягом 20 хв.

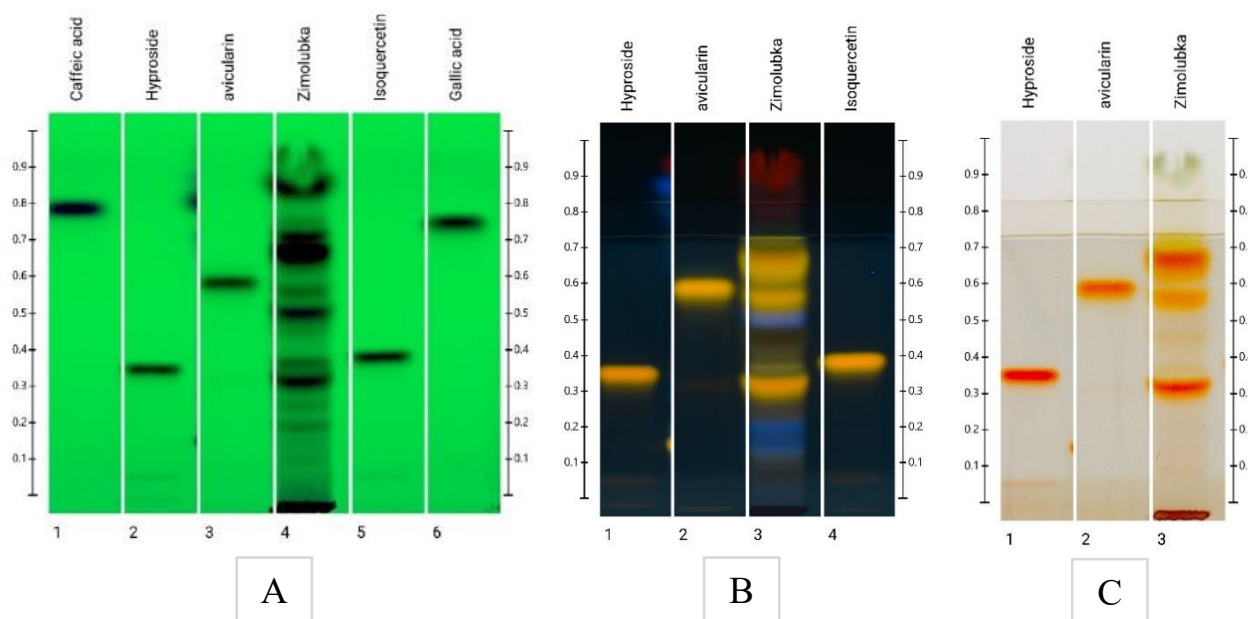


Рис. 3.3 Профіль ВЕТШХ зразку зимолюбки (100% метанол) і визначених стандартів під УФ 254 нм (А) до дериватизації та під УФ 366 нм після дериватизації (В) і білим світлом після дериватизації (С)

Отримані екстракти фільтрували через шприцеві фільтри 0,45 мкм (Carl Roth GmbH & Co. KG, Карлсруе, Німеччина) і зберігали при 4 °C до аналізу.

Для обрання оптимального екстрента для трави зимолюбки, спочатку наважку (0,2 г) екстрагували водою, 50% метанолом та 100% метанолом та оцінювали вміст БАР (табл. 3.1, рис. 3.4).

В результаті було визначено, що 50 % метанол вилучає найбільший вміст речовин (рис. 3.5-3.6). Для попереднього скринінгу речовин у екстрактах зимолюбки використовували методику ВЕРХ з діодно-матричним детектором (табл. 3.1).

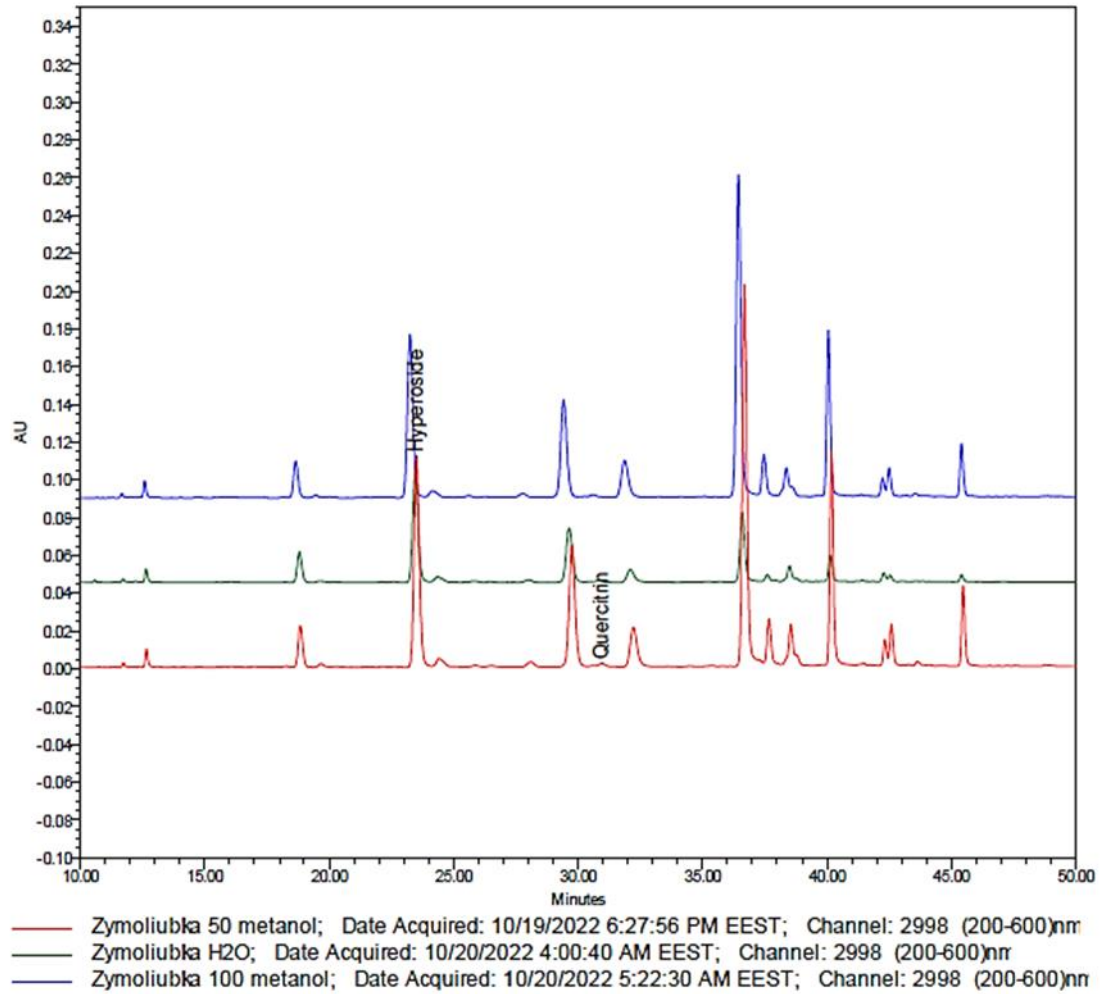


Рис. 3.4 Загальний вигляд ВЕРХ хроматограм екстрактів зимолюбки (повний спектр 200-600 нм), що одержано різними розчинниками: червона лінія – 50 % метанол; зелена лінія – вода; синя лінія – 100% метанол

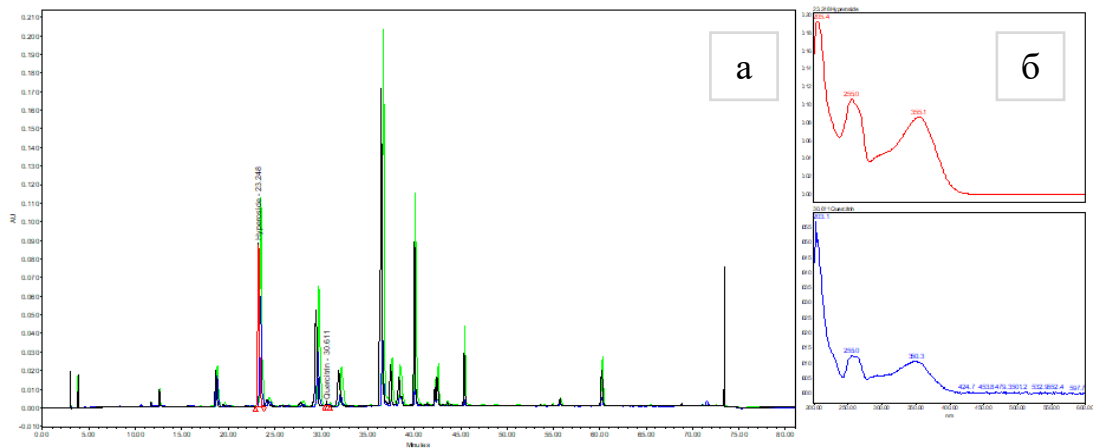


Рис. 3.5 ВЕРХ хроматограма метанольного екстракту трави зимолюбки (а) та УФ-спектри двох речовин-маркерів – гіперозид та кверцитрин (б)

Таблиця 3.1

**Вміст ідентифікованих речовин (мг/г) у екстрактах зимолубки
методом ВЕРХ**

№ з\п	Речовина	Час утримування	50% метанол	100% метанол	Вода
1.	Апігенін	48.776	0,01 ± 0,00	-	-
2.	Гіперозид	23.512	3,71 ± 0,06	2,90 ± 0,05	2,02 ± 0,04
3.	Кверцитрин	30.828	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
4.	Рутин	23.248	4,16 ± 0,07	3,29 ± 0,06	2,28 ± 0,04
5.	Кверцетин	43.643	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	-
6.	Галова кислота	6.008	0,25 ± 0,04	-	-
7.	Гуаяверин	29.422	3,99 ± 0,08	3,25 ± 0,06	1,83 ± 0,03
8.	Ізокверцетин	24.746	0,05 ± 0,01	-	-

Для оцінки антиоксидантного потенціалу окремих фенольних сполук *in vitro* у траві зимолубки, було використано метод ВЕРХ/ABTS з постколунковою дериватизацією (рис. 3.6).

Обраний метод ВЕРХ-ABTS використано для попередньої оцінки антиоксидантного вкладу окремих фенольних сполук у загальну ефективність екстракту трави зимолубки. Два піки при 10 та 14 хв (пік 1, пік 2) свідчать про виражену антиоксидантну активність даних сполук. Дані сполуки не була точно ідентифіковані, але порівнюючи час виходу та УФ-спектр можна припустити, що це похідні кавової кислоти.

Пік при 23,5 хв (пік 3) відповідає гіперозиду, що також було ідентифіковано ВЕРХ методом, але речовина показала помірну антиоксидантну дію.

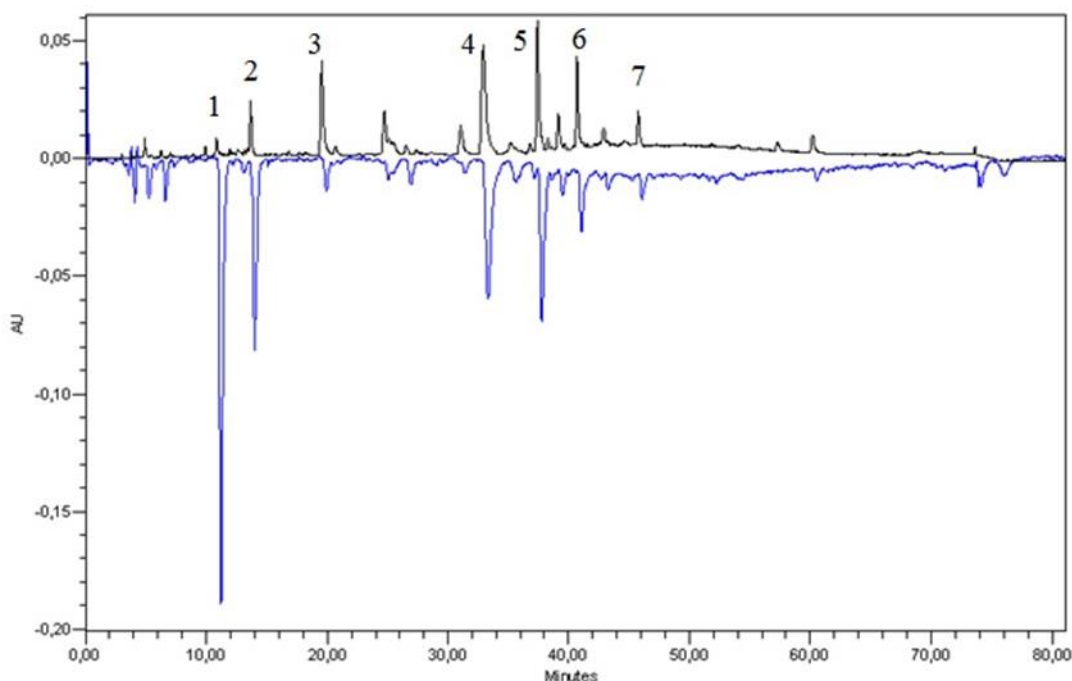


Рис. 3.6 Хроматограма ВЕРХ/ABTS екстракту трави зимолубки (50% метанол) при 247 нм (HPLC, чорний) і 650 нм (ABTS, синій)

При 33,5 хв (пік 4) та при 40 хв (пік 5) вірогідно похідні флавону, речовини точно не ідентифіковано, але вони проявили антиоксидантний ефект.

При 43,6 хв (пік 6) ідентифіковано кверцетин. Незважаючи на те, що речовина має менший вміст, ніж гіперозид, вона показала порівняно більшу антиоксидантну дію, хоча порівняно з іншими неідентифікованими речовинами – меншу ефективність.

Менш виражений пік при 46,8 хв (пік 7) ідентифіковано як апігенін, який показав помірний вклад у антиоксидантний ефект трави зимолубки.

3.2 Дослідження амінокислотного складу трави зимолубки зонтичної

Амінокислоти відповідають за процеси метаболізму і енергетичний обмін, забезпечуючи роботу організму. Амінокислоти безпосередньо впливають на стан нервової системи, регулюючи розумову діяльність, настрій і сон [76, 78]. Ці компоненти необхідні для формування м'язів, сухожиль і

зв'язок, а також волосся і шкіри [69]. Завдяки своїй участі у детоксикації аміаку та підтримці роботи головного мозку, глютамінова кислота сприяє поліпшенню загального стану пацієнтів при метаболічних розладах і деяких хронічних захворюваннях [2; 9; 18].

Кількісне визначення амінокислот у траві зимоліубки зонтичної проводили методом ГХ-МС. Результати визначення якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у траві зимоліубки зонтичної представлено на рис. 3.7 і у табл. 3.2. За результатами дослідження встановлений вміст амінокислот у такій послідовності за зменшенням: L-глютамінова кислота>L-аланін>L-аспарагінова кислота> L-валін> L-пролін> ізолейцин> L-лейцин [3].

Таблиця 3.2

Вміст амінокислот у траві зимоліубки зонтичної

Амінокислота	Вміст, $\mu\text{g/g}$	Амінокислота	Вміст, $\mu\text{g/g}$
L-аланін	4.030	L-пролін	0.166
L-валін	0.264	L-аспарагінова кислота	3.313
L-лейцин	0.050	L-глютамінова кислота	14.469
ізолейцин	0.128		

Примітка. n=3, P=0,95.

L-глютамінова кислота значно відрізняється за вмістом у траві зимоліубки зонтичної у порівнянні з іншими визначеними амінокислотами. Ця амінокислота бере участь у процесах переамінування амінокислот в організмі [64]. Бере участь у білковому і вуглеводному обміні, стимулює окислювальні процеси, сприяє знешкодженню та виведенню з організму аміаку, підвищує стійкість організму до гіпоксії. Сприяє синтезу ацетилхоліну й АТФ, перенесенню іонів калію, відіграє важливу роль у діяльності скелетних м'язів.

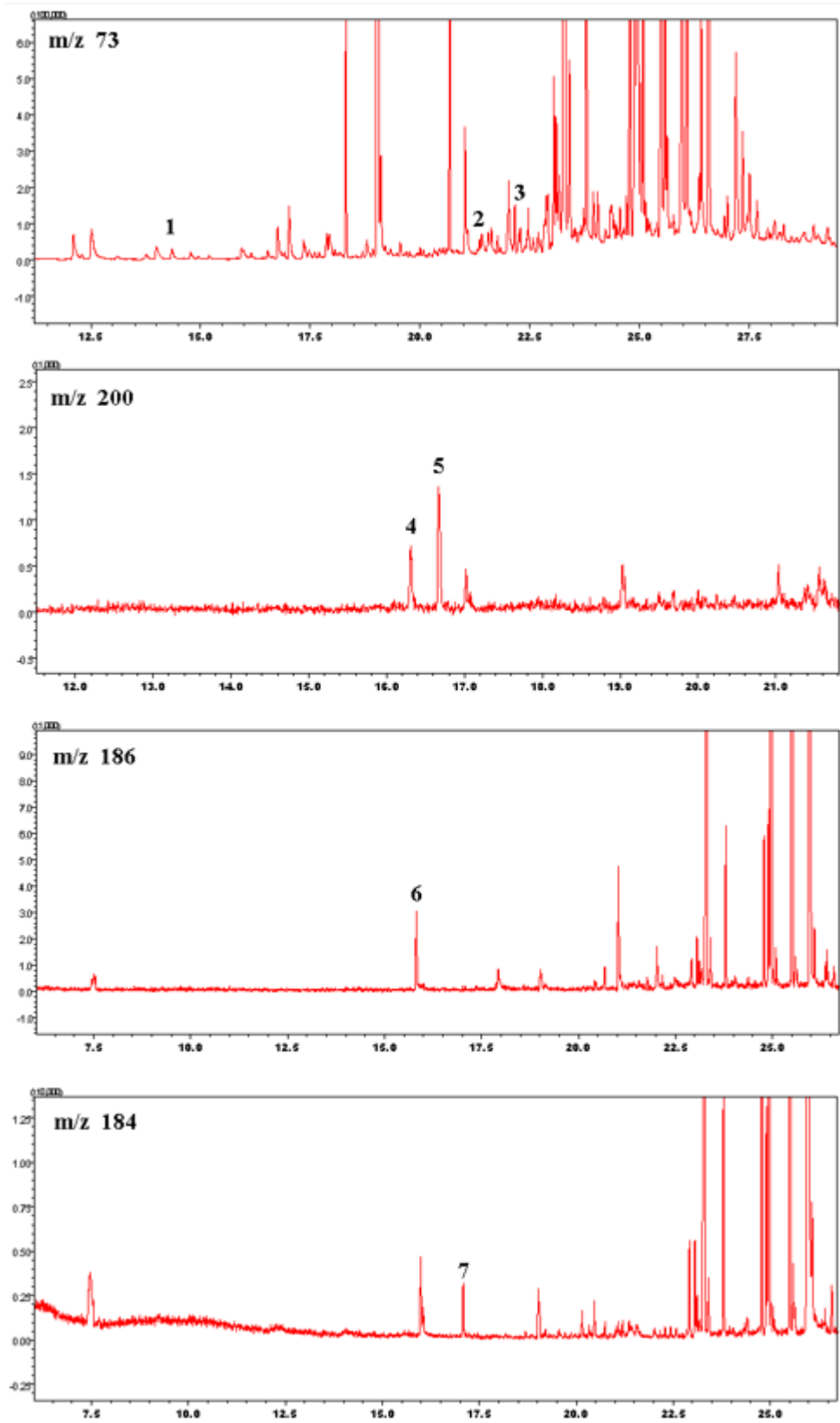


Рис. 3.7 Хроматограма визначення амінокислот у траві зимолубки зонтичної методом ГХ-МС

Аланін має здатність знижувати ризик розвитку каменів у нирках, він є основою нормального обміну речовин в організмі, сприяє боротьбі з гіпоглікемією; сприяє пом'якшенню коливань рівня глюкози в крові між прийомами їжі. Є одним із основних джерел енергії м'язів. Підвищує рівень енергетичного обміну, стимулює імунітет, регулює рівень цукру в крові. Необхідний для підтримки тону м'язів і адекватної статевої функції [1].

Має значення також вміст аспарагінової кислоти – попередника лізину і донора аміногруп у біосинтезі замінних амінокислот. Аспарагінова кислота стимулює синтез білка, знижує рівень аміаку в крові, нормалізує роботу печінки [2].

Лікарські рослини, що містять значну кількість амінокислот, є перспективними для створення нових лікарських препаратів [18].

3.3 Дослідження біологічно активних речовин, що переганяються з водяною парою

Методом ГХ-МС (методика наведена у розділі 2) у траві зимолубки зонтичної ідентифіковано та кількісно визначено 21 речовину (рис. 3.8), що переганяються з водяною парою. Результати наведені на рис.3.8 та у табл. 3.3. Були визначені спирти (гексанол-3, октанол-3), альдегіди, ацеталі і кетони (гексаналь, октанон-3, гексагідрофарнезилацетон), терпеноїди (β -бурбонен, β -елемен, α -селінен, γ -кадінен, каламенен, дигідроактинідіолід, спатуленол, каріофіленоксид), алкани (тетрадекан), похідні ароматичних карбонових кислот (фталат), фенольні сполуки – флавон, алкани (гептакозан, нонакозан), алкадієни (1,21-докозадієн), фітостерини (γ -ситостерол).

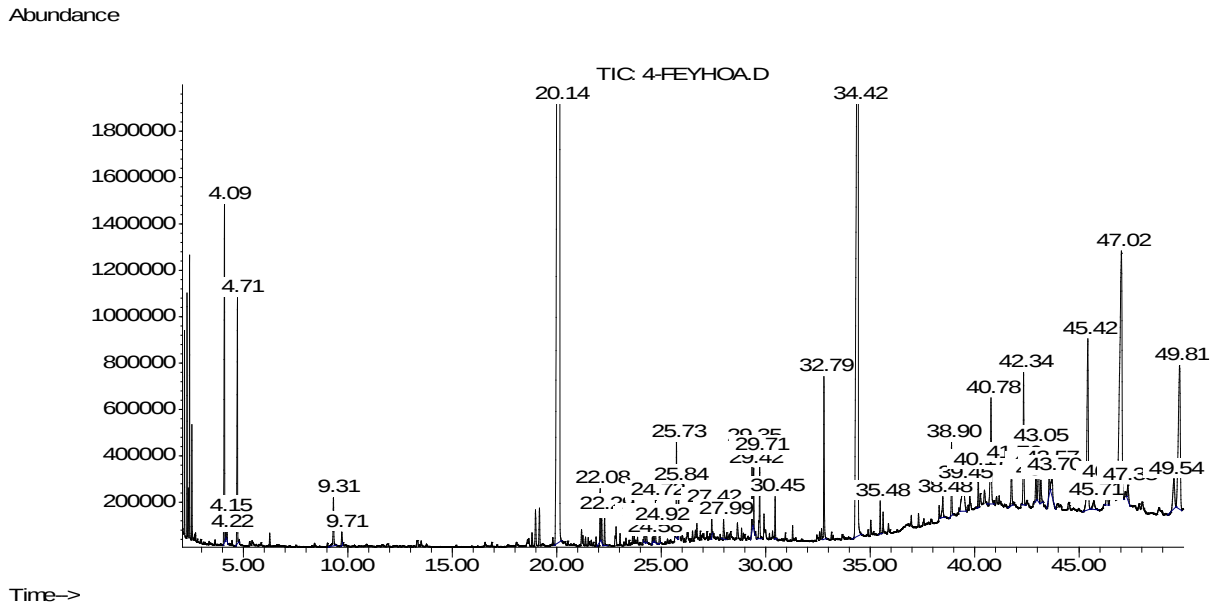


Рис. 3.8 Хроматограма БАР трави зимолубки зонтичної

Таблиця 3.3

Результати ХМСМ дослідження трави зимолубки зонтичної

Номер піка на хромато грамі	Час утримуван ня, хв	Площа піка, мВ·с	Назва речовини	Вміст, мкг/г
1	2	3	4	5
2	4.15	1240826	гексанол-3	1.1
3	4.21	435758	гексаналь	0.8
5	9.31	5818043	октанон-3	4.8
7	20.13	499744780	зн-ст	385.2
8	22.07	3741502	β-бурбонен	3.1
9	22.15	2202932	β-елемен	1.5
10	22.29	2679420	тетрадекан	2.1
11	24.19	1694304	α-селінен	1.7
13	24.57	445112	γ-кадінен	0.4

Продовж. табл. 3.3

1	2	3	4	5
15	24.72	3426797	каламенен	2.3
16	24.92	1676540	дигідроактинідіолід	0.3
17	25.72	7904796	спатуленол	3.1
18	25.83	3922275	каріофіленоксид	2.5
21	29.34	6756781	транс-неофітадієн	5.3
22	29.42	4451925	гексагідрофарнезилацетон	2.1
23	29.71	8079838	фталат	6.3
26	34.42	196031619	флавон	90.5
29	38.89	6476531	гептакозан	5.1
32	40.78	16015179	нонакозан	12.5
34	42.34	15387885	1,21-докозадієн	12.0
43	47.02	81847955	γ-ситостерол	42.9

3.4 Дослідження макро- та мікроелементного складу трави зимолюбки зонтичної

Відомо, що обмінні процеси на клітинному і субклітинному рівнях забезпечуються функціонуванням близько 2000 ферментів, кожен з яких каталізує відповідну хімічну реакцію. У свою чергу, каталітична активність ферментів забезпечується коферментами небілкового походження – органічними сполуками або неорганічними елементами (іонами металів – макро- і мікроелементами) [34]. Таким чином, мікроелементи є найважливішими каталізаторами обмінних процесів і відіграють важливу роль в адаптації організму в нормі і в умовах патології. Незважаючи на те, що мінеральні речовини не мають енергетичної цінності, як білки, жири і вуглеводи, багато ферментативних процесів в організмі неможливі без участі тих або інших елементів [7, 8].

Методом атомно-емісійної спектрографії у траві зимолюбки зонтичної було визначено вміст макро- та мікроелементів. Результати наведено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Визначення мінерального складу трави зимолюбки зонтичної

Найменування елемента	Вміст в мкг/100г	Найменування елемента	Вміст в мкг/100г
Fe	9,00	Mo	0,06
Si	420,00	Ca	530,00
P	125,00	Cu	2,50
Al	26,00	Zn	0,65
Mn	18,00	Na	862,00
Mg	231,00	K	1368,00
Ni	0,12		

Примітка. Co<0.003; Cd<0,001; As<0,001; Hg<0,001; Sr<0,1, Pb<0,03.

Серед елементів з найбільшим вмістом (мкг/100г) слід відзначити натрій (862,00), калій (1368,00), сіліцій (420,00), магній (231,00), фосфор (125,00); серед мікроелементів: кальцій (530,00), манган (18,00), ферум (9,00) [20].

3.5 Визначення мікроскопічних діагностичних ознак та гістохімічні дослідження трави зимолюбки зонтичної

Мікроскопічне та гістохімічне вивчення трави зимолюбки зонтичної *Chimaphilla umbellata* (L.) W. Barton проведено для розробки відповідних розділів нормативної документації на сировину [25].

Гістохімічні реакції

На ліпофільні сполуки: кутин та краплі ліпідної природи.

Поперечний переріз, верхню та нижню епідерми листка *Ch. umbellata* поміщали в розчин Судану III на 3-4 хвилини, залишки реактиву прибирали фільтрувальним папером, зріз промивали у 50 % етанолі. Очищений від залишків реактиву зріз переносили у краплю гліцерину і розглядали під мікроскопом. Кутин та ліпідні краплі забарвлюються в рожево-помаранчевий колір.

На дубильні речовини:

На поперечний переріз листка, стебла та верхньої, нижньої епідерми нанесли кілька крапель 1% розчину феруму (III) хлориду. Через 3 хвилини залишки реактиву видаляють фільтрувальним папером, а зрізи розміщують в краплях води і розглядають під мікроскопом. Клітини, що містять дубильні речовини забарвлюються в синьо-чорний колір.

На арбутин:

На поперечний переріз стебла, листка та верхньої, нижньої епідерми нанесли кілька крапель розведеної азотної кислоти. Зрізи зразу розглядали під мікроскопом, оскільки реакція проходила дуже інтенсивно і клітини, що містять арбутин спочатку забарвлювалися в яскраво-помаранчевий колір, а потім швидко переходили в світло- жовтий.

На здерев'яніння:

Для виявлення клітин з лігніфікованими стінками поміщали поперечний переріз стебла у 1% етанольний розчин флороглюцину, а потім фільтрувальним папером видаляли залишки реактиву і наносили одну краплю хлористоводневої кислоти. Через хвилину зріз переносили у краплю гліцерину та розглядали під мікроскопом. Під дією реактивів здерев'янілі оболонки набували яскраво-малинового забарвлення.

Мікроскопічні ознаки

Листок *Chimaphilla umbellata* дорзовентральний, гіпостоматичний. На поверхні, як адаксіальної, так і абаксіальної епідерми виражено залягають шари кутину, наявність якого підтвердили і гістохімічні реакції.

Нижня епідерма представлена звивистостінними клітинами, що мають товсті оболонки з простими прямими порами (Рис. 3.9.А-D). В ній досить щільно розташовуються актиноцитні продихові апарати (Рис. 3.9. С, D 1). Продихи поверхневі не занурені в епідерму. Продиховий індекс складає $-21,2 \pm 0,32$, що свідчить про середній ступінь транспірації.

При просвітленні препаратів хлоралгідратом мезофіл висвітлювався до світло помаранчевого кольору і в один два шари щільно прилягав до нижньої епідерми (Рис 3.9.А-В 2).

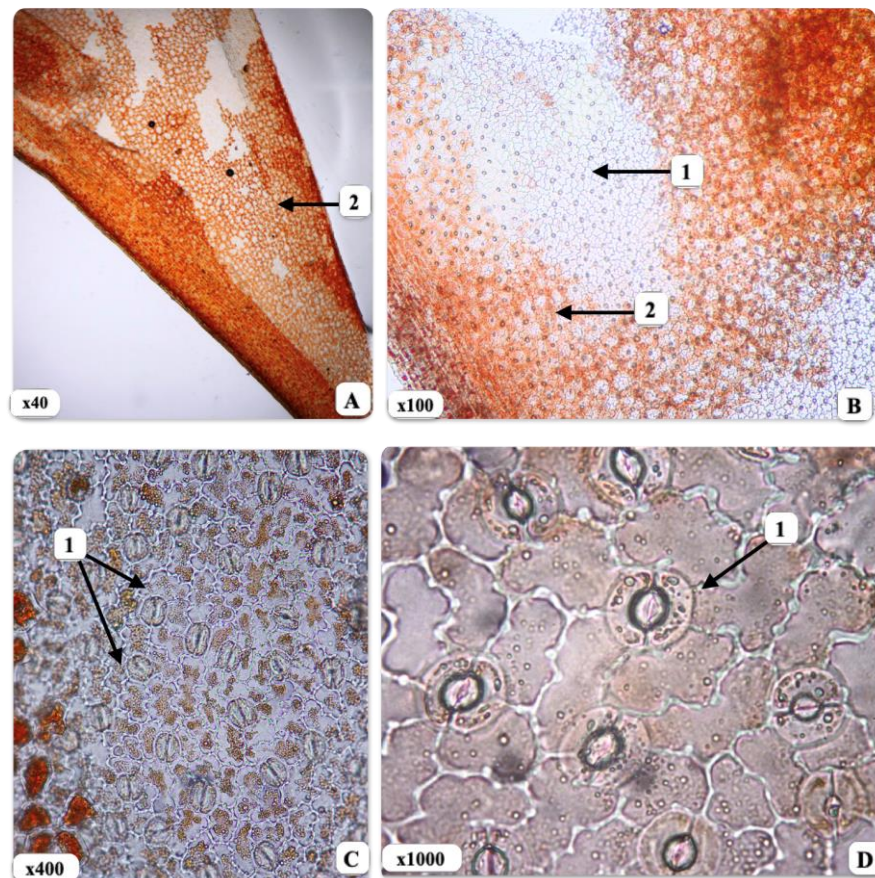


Рис. 3.9 Нижня епідерма листка *Ch. umbellata* (знебарвлена хлоралгідратом): 1- актиноцитний продиховий апарат, 2 – клітини мезофілу.

Без проварювання епідерми в хлоралгідраті мезофіл, що прилягає до нижньої епідерми буро-коричневого кольору, продихи ледь проглядаються (Рис. 3.10. А-D 1). Стають добре помітні міжклітинники аеренхімного шару, що знаходяться під епідермою (Рис. 3.10. В, D 4). Клітини епідерми, що вкривають жилки – прямокутної форми, товстостінні з простими прямими

порами (Рис. 3.10. С 3). В місцях де добре відділився мезофіл в епідермі чітко видно речовини ліпідної природи у формі кульок світло-жовтого кольору, які густо розташовуються в епідермі (Рис. 3.10. А 2).

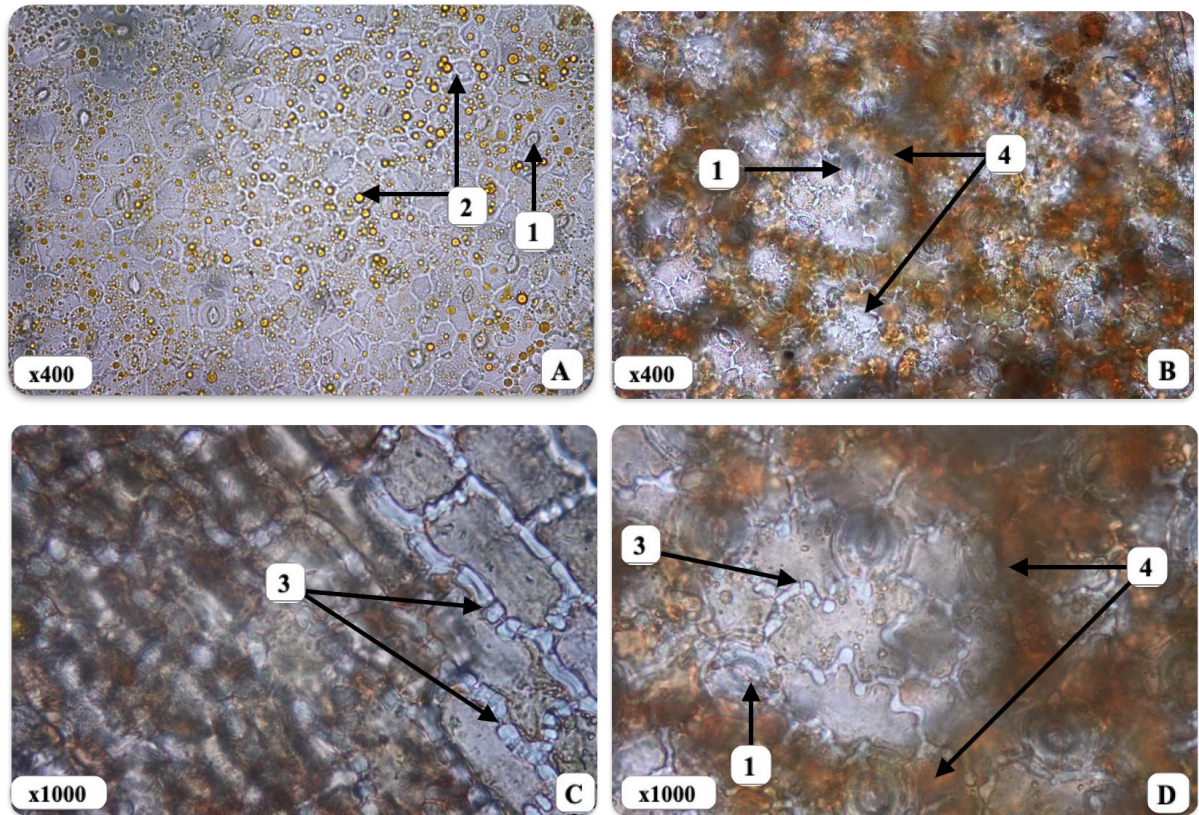


Рис. 3.10 Нижня епідерма листка *Ch. umbellata*: 1 – актиноцитний продиховий апарат, 2 – ліпідні включення, 3 – прості прямі пори, клітин епідерми над жилками, 4 – аеренхіма мезофілу.

Клітини верхньої епідерми мають більш правильну видовжено-прямокутну форму з незначними звивистими вигинами. Клітинні стінки потовщені з простими прямими порами (Рис. 3.11 В, Е 2). При відділенні верхньої епідерми разом з одним двома шарами мезофілу відділяються магістральні, кільчасті судини жилок листка (Рис. 3.11 А-Д 1). Біля жилок концентруються скупчення кристалів оксалату кальцію – друзи. (Рис. 3.11 В-Д 4). Мезофіл кулястої форми, висвітлюється хлоралгідратом у світло-жовтий колір і в кілька шарів щільно прилягає до верхньої епідерми (Рис. 3.11 F 3).

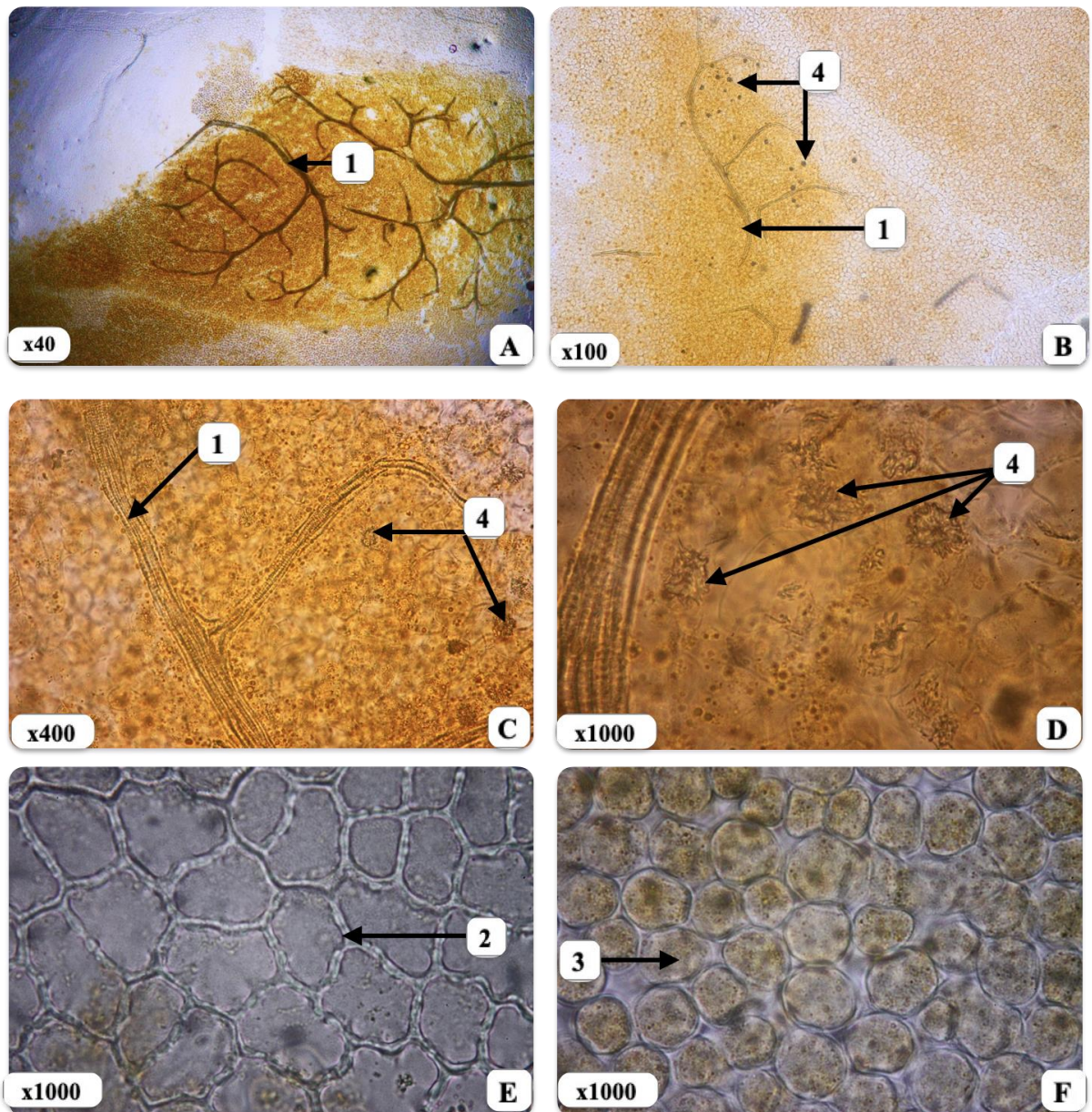


Рис. 3.11 Верхня епідерма листка *Ch. umbellata* (знебарвлена хлоралгідратом): 1 – магістральні жилки, 2 – клітини епідерми з простими прямими порами, 3 – мезофіл, 4 – друзи

Без обробки верхньої епідерми хлоралгідратом, мезофіл має насичено коричнево-брунатний колір і щільно без наявних міжклітинників прилягає до неї (Рис. 3.12 А-D 1). При великому збільшенні добре проглядаються прості прямі пори в клітинах (Рис. 3.12 А-D 2). Краплі ліпідної природи мають меншу густоту і розмір у порівнянні з нижньою епідермою і добре ідентифікуються на збільшенні в x1000 раз (Рис 3.12 D 3).

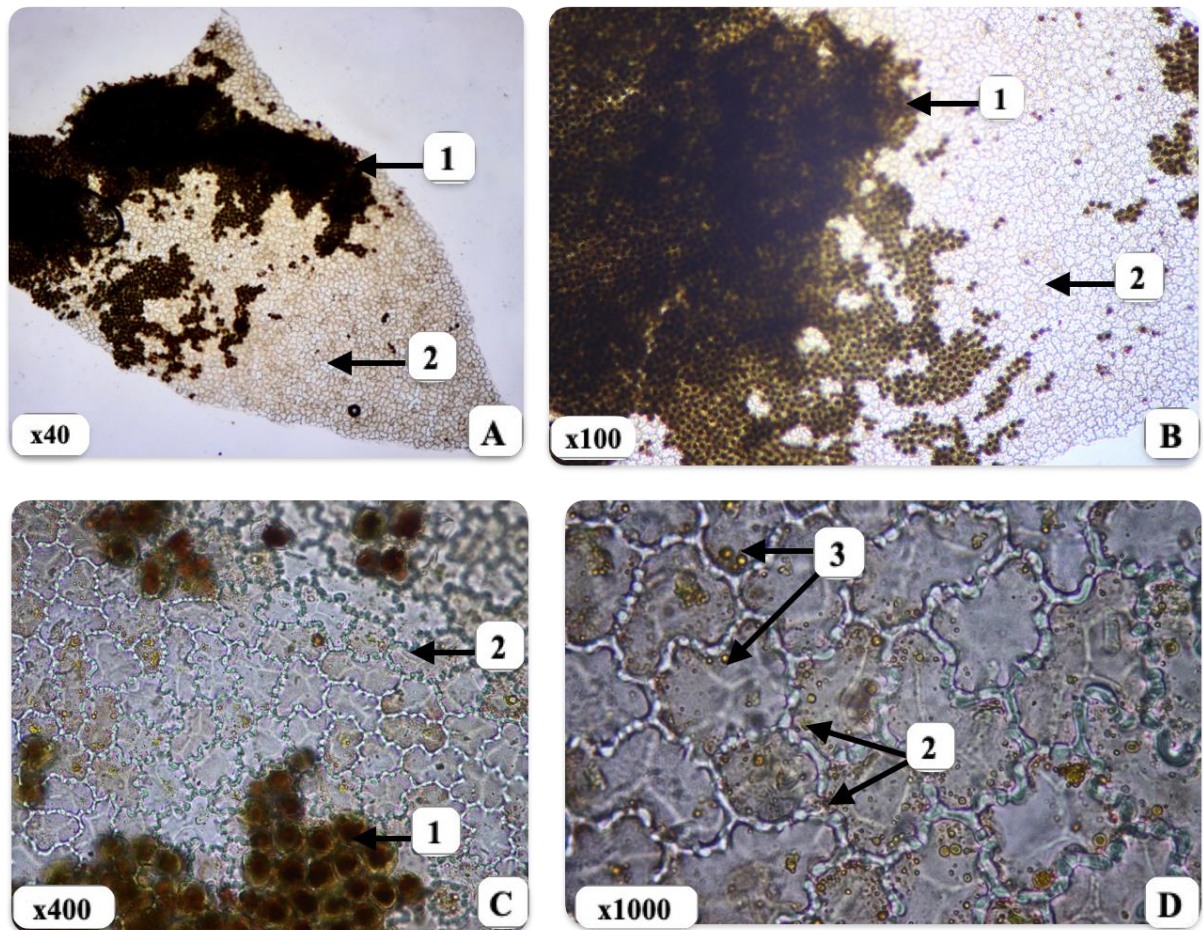


Рис. 3.12 Верхня епідерма листка *Ch. umbellata*: 1 – клітини мезофілу, 2 – клітини епідерми з простими прями порами, 3 – включення ліпідної природи

Поперечний переріз через листкову пластинку дає змогу побачити всі структури типового дорзовентрального листка. Зовнішня стінка клітин верхньої та нижньої епідерми сильно потовщена і кутинізована, кутикула товста (Рис. 3.13 А, В, D 2). Далі під верхньою епідермою від трьох до п'яти рядів стовпчастого (палісадного) мезофілу, що займає до половини м'якоті листка, заповненого коричнево-червоним вмістом (Рис. 3.13 С 4), за яким аж до нижньої епідерми залягають пухко розташовані клітини губчастого мезофілу, що утворюють розвинену систему міжклітинників (Рис. 3.13.С 3). У центрі листка розміщується крупний колатеральний закритий судинно-волокнистий пучок, по обидва боки якого в мезофілі функціонують більш дрібні пучки по 8-10 в кожену сторону (Рис. 3.13 А-С 1). По обидва боки

центрального судинно-волокнистого пучка видні тяжі коленхіми (Рис. 3.13.С 5).

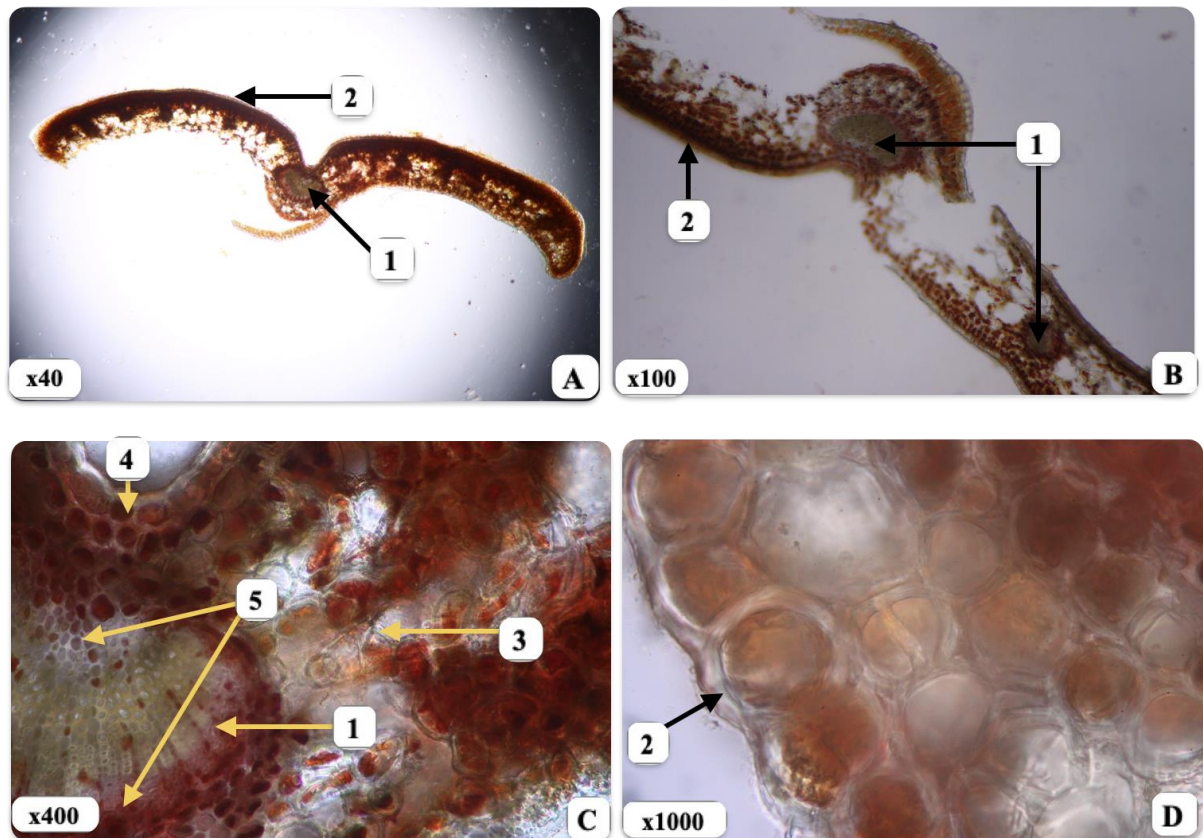


Рис. 3.13 Поперечний переріз через листок *Ch. umbellata*: 1 – судинно-волокнистий пучок, 2 – шар кутикули, 3 – губчастий мезофіл, 4 – стовпчастий мезофіл, 5 – тяжі коленхіми.

Поперечний переріз стебла відображає безпучковий тип анатомічної будови. Стебло вкрите перидермою (Рис. 3.14 D 1) з неоднорідним верхнім рядом клітин, залишків епідерми, зовнішній поверхня якої має добре розвинений кутикулярний шар (Рис. 3.14 D 8), типовий для ксерофільних рослин, з бородавчастими, сосочкоподібними трихомами (Рис. 3.14. D 6). За перидермою розташовується шар лубу, представлений луб'яними волокнами, луб'яною паренхімою, ситоподібними рубками з клітинами супутницями (Рис. 3.14. А-С 2). За лубом розміщується кількох шарове кільце камбіальних клітин (Рис. 3.14. В, С 3). Нижче камбію сформована смуга клітин деревини,

що має в своєму складі судини і трахеїди деревини, деревну паренхіму і волокна (Рис. 3.14. А-С 4).

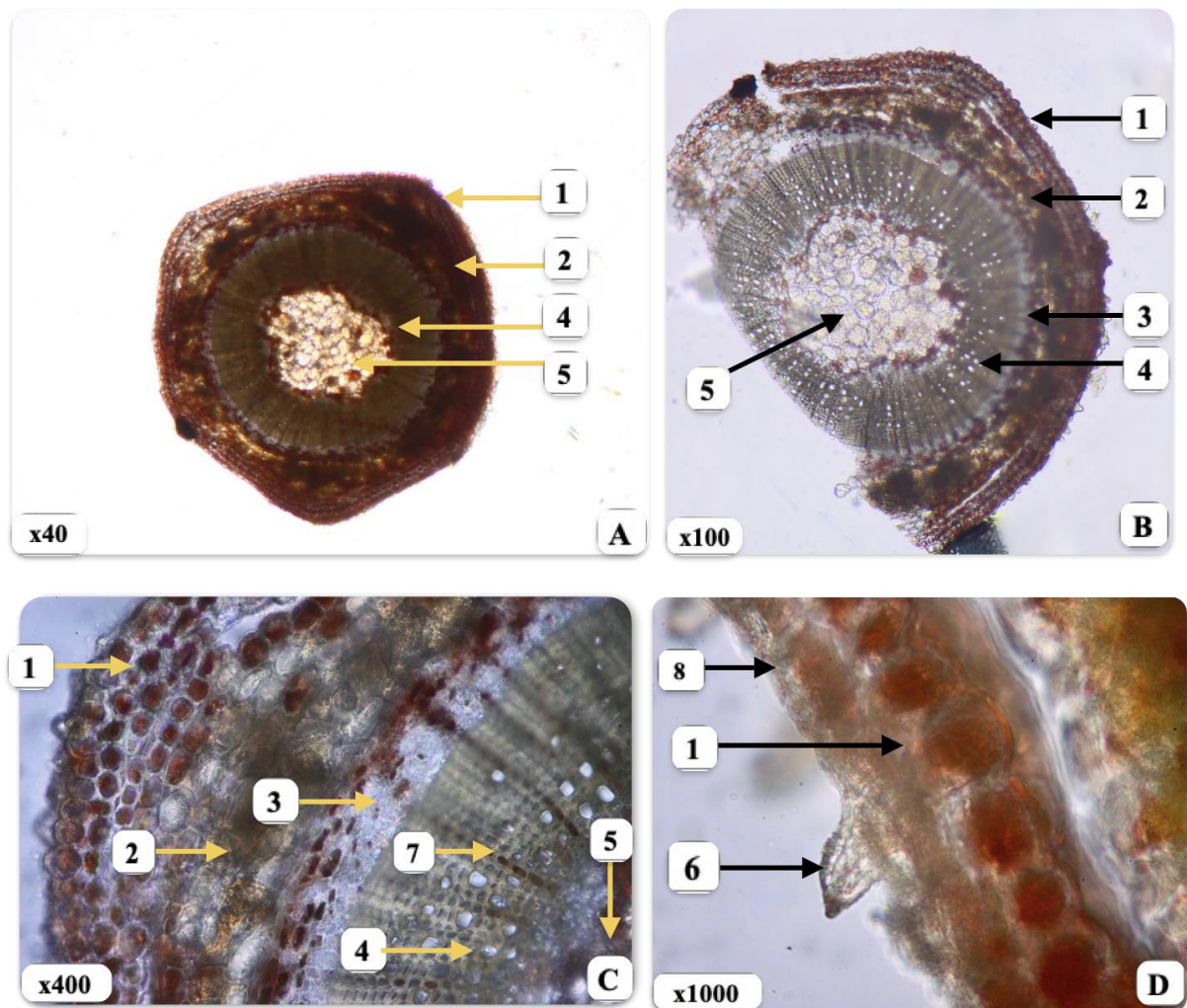


Рис. 3.14 Поперечний переріз через стебло *Ch. umbellata*: 1 – перидерма, 2 – луб, 3 – камбій, 4 – деревина, 5 – серцевина, 6 – сосочкоподібна трихома, 7 – серцевинні промені, 8 – кутикулярний шар

Центр стебла займають клітини основної паренхіми серцевини, з заповненим буро-коричневим вмістом клітинами, що розташовуються по периферії (Рис. 3.14. А-С 5). Від луб'яної частини до серцевини через усю деревину і камбій простягаються серцевинні промені (Рис. 3.14. С 7).

Для підтвердження наявності певних біологічно активних речовин ми провели ряд гістохімічних реакцій.

Реакція з Суданом III дала позитивний результат і забарвила жовті краплі ліпідної природи, що містилися в епідермі листка, у рожево-помаранчевий колір (Рис. 3.15. A-D).

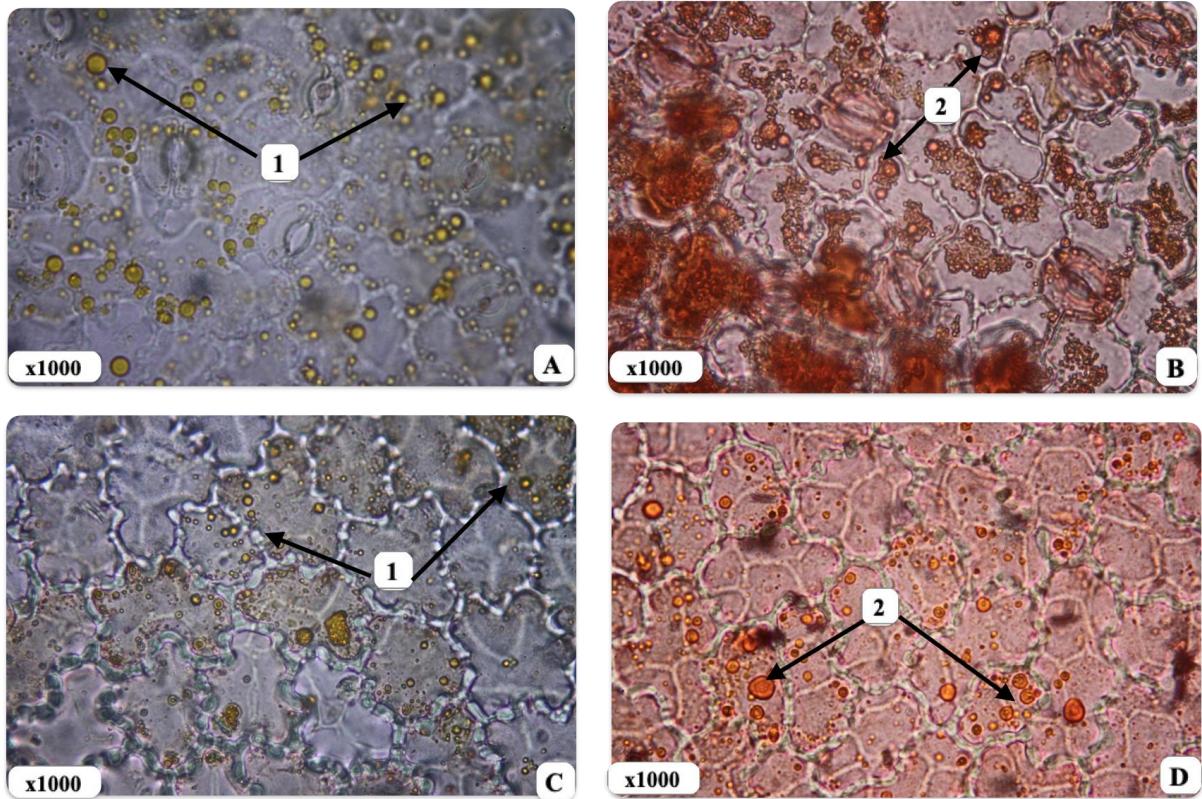


Рис. 3.15 Встановлення локалізації речовин ліпідної природи у нижній A,B та верхній C,D епідермі листка *Ch. umbellata*: A,C – до реакції, B,D – результат реакції. 1. – краплі ліпідної природи до реакції, 2 – краплі ліпідної природи під дією Судану III.

Кутин, що знаходився в потовщеній зовнішній стінці верхньої та нижньої епідерми листка– кутикулі та кутинізованих залишках епідерми стебла, під дією Судану III набув рожево-помаранчевого кольору (Рис. 3.16, 3.17. A-D).

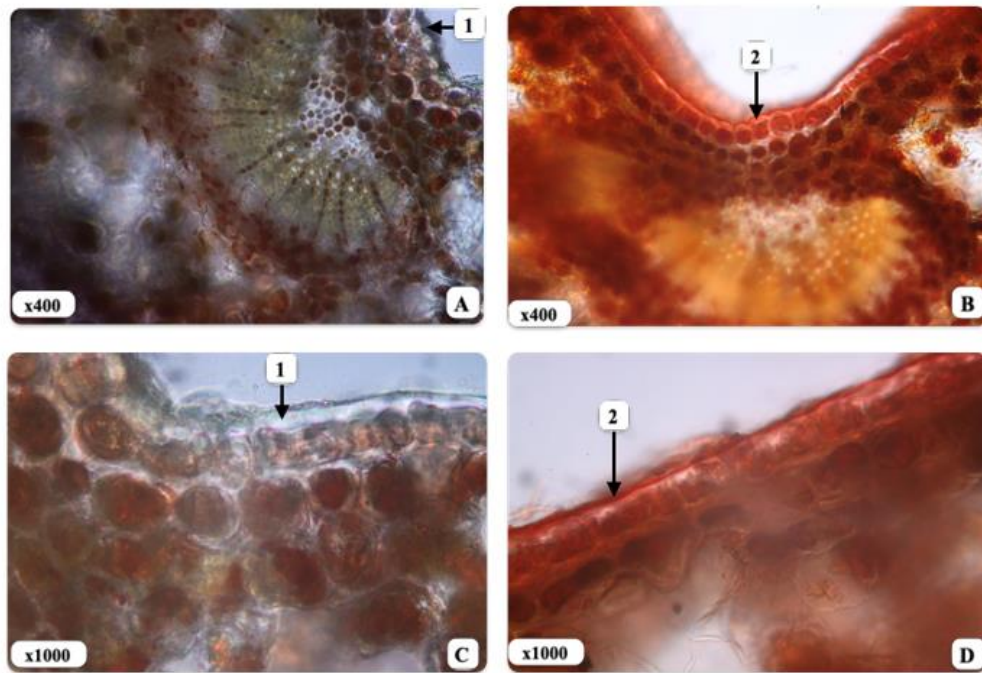


Рис. 3.16 Виявлення кутину на поперечному перерізі листка *Ch. umbellata*: A,C – до реакції, B,D – результат реакції. 1. – кутикула до реакції (A,B – верхня, C,D – нижня), 2 – шар кутину під дією Судану III.

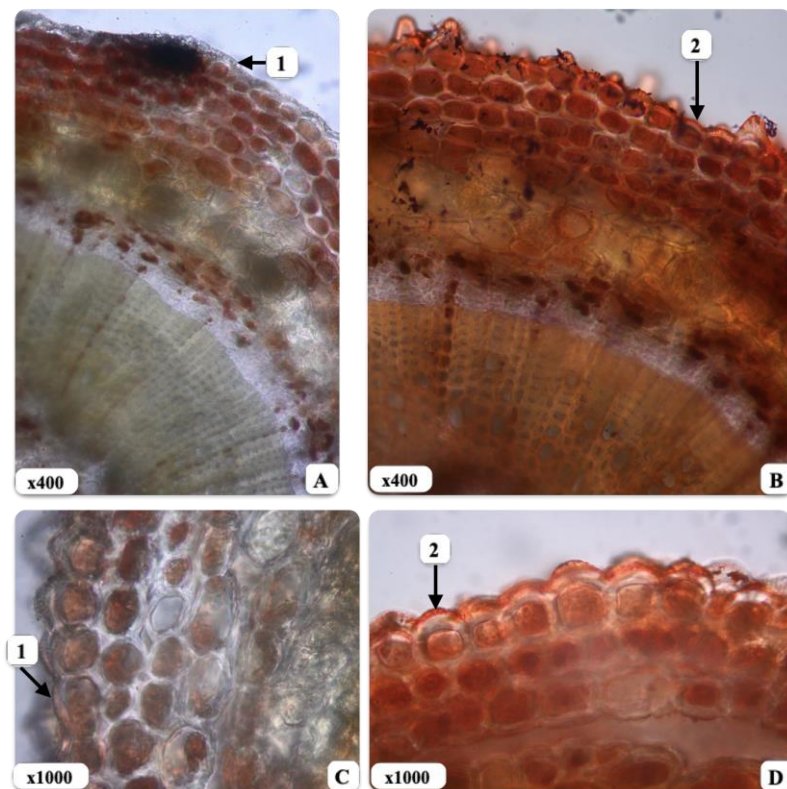


Рис. 3.17 Ідентифікація кутину на поперечному перерізі стебла *Ch. umbellata*: A,C – до реакції, B,D – результат реакції. 1 – кутикула до реакції (A,B – верхня, C,D – нижня), 2 – шар кутину під дією Судану III

Для підтвердження наявності та встановлення місць локалізації дубильних речовин в сировині *Ch. umbellata* були проведені реакції на зрізах епідерми листової пластинки, поперечного перерізу листка та стебла з FeCl_3 .

Дубильні речовини під дією реактиву забарвлюються в синьо-чорний колір і у нижній епідермі листка *Ch. umbellata* концентруються у пухкому мезофілі з великою кількістю крупних міжклітинників (Рис. 3.18. В) у верхній – знаходяться у щільно розташованих однорідних клітинах мезофілу (Рис.3.18. D).

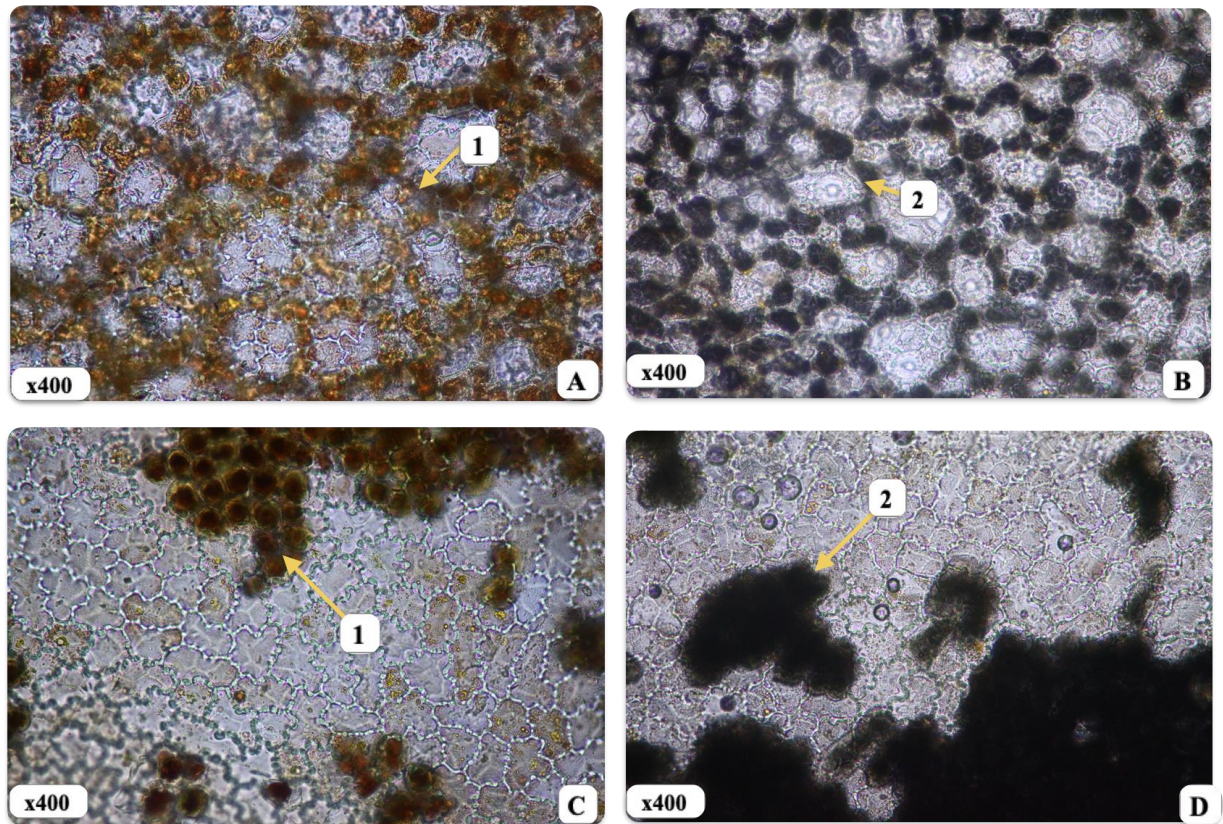


Рис. 3.18 Локалізація танінів у нижній А,В та верхній С,Д епідермі листка *Ch. umbellata*: А, С – до реакції, В, D – результат реакції. 1. – клітини мезофілу нижньої та верхньої епідерми до реакції, 2 – результат реакції з FeCl_3

Локалізація дубильних речовин, забарвлених у синьо-чорний колір, при поперечному перерізі листка розміщується у щільній стовпчастій паренхімі, яка знаходиться під верхньою епідермою і кількох шарах губчастої, що знаходиться нижче, а також в клітинах основної паренхіми навколо

судинно-волокнистого пучка та в декількох нижніх рядах мезофілу, що прилягають до нижньої епідерми (Рис. 3.19. А-D).

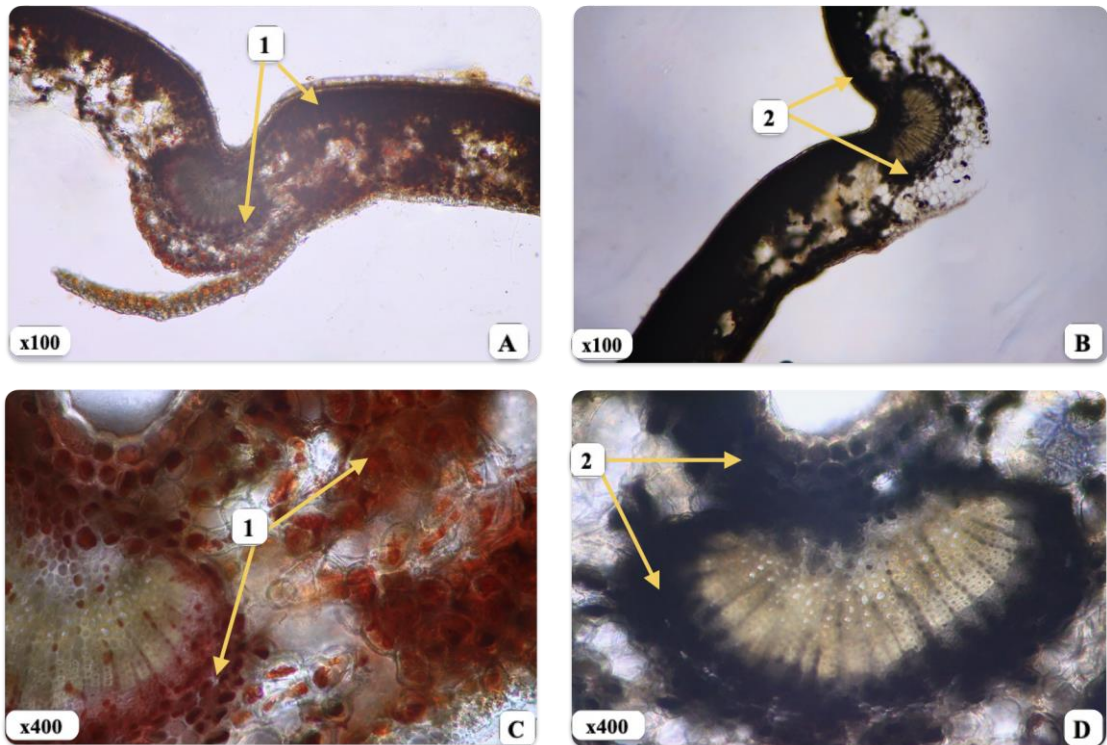


Рис. 3.19 Наявність танінів на поперечному перерізі листка *Ch. umbellata*: А,С – до реакції, В,Д – результат реакції. 1. – мезофіл до реакції, 2 – результат реакції з FeCl₃.

На поперечному перерізі стебла місця зосередження дубильних речовини синьо-чорного забарвлення розташовані в перидермі, луб'яній паренхімі і одношаровому кільці паренхімних клітин серцевини, що відділяє таким чином деревину від серцевини та безпосередньо в поодиноких клітинах серцевини (Рис. 3.20. А- D).

Оскільки за літературними даними сировина *Ch. umbellata* містить арбутин, то на встановлення місць його локалізації була проведена реакція з розведеною нітратною кислотою.

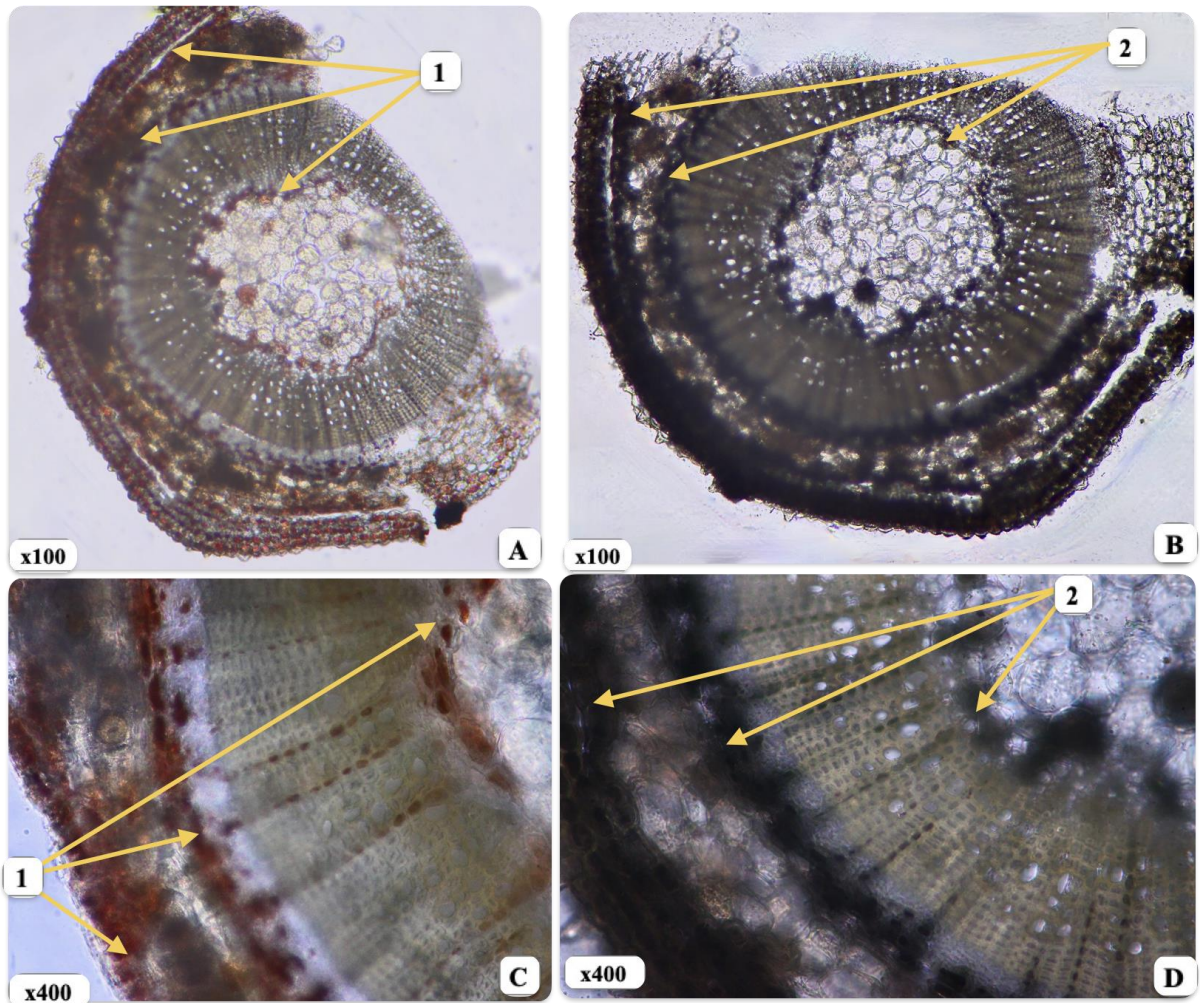


Рис. 3.20 Виявлення танінів на поперечному перерізі стебла *Ch. umbellata*: A, C – до реакції, B, D – результат реакції. 1 – місця потенційної концентрації дубильних речовин, 2 – результат реакції з FeCl_3

Забарвлення клітин, що містили арбутин в епідермі, поперечному перерізі стебла і листка, було на початку реакції насичено-помаранчевим і швидко переходило в світло-жовте та супроводжувалося інтенсивним виділенням пухирців газу.

У нижній та верхній епідермі арбутин накопичувався в клітинах стовпчастого та губчатого мезофілу (Рис. 3.21. A-D). Дані місця локалізації арбутину прослідковувалися і при поперечному перерізі листка, а також додалася їх концентрація навколо судинно-волокнистого пучка (Рис. 3.22 A-D).

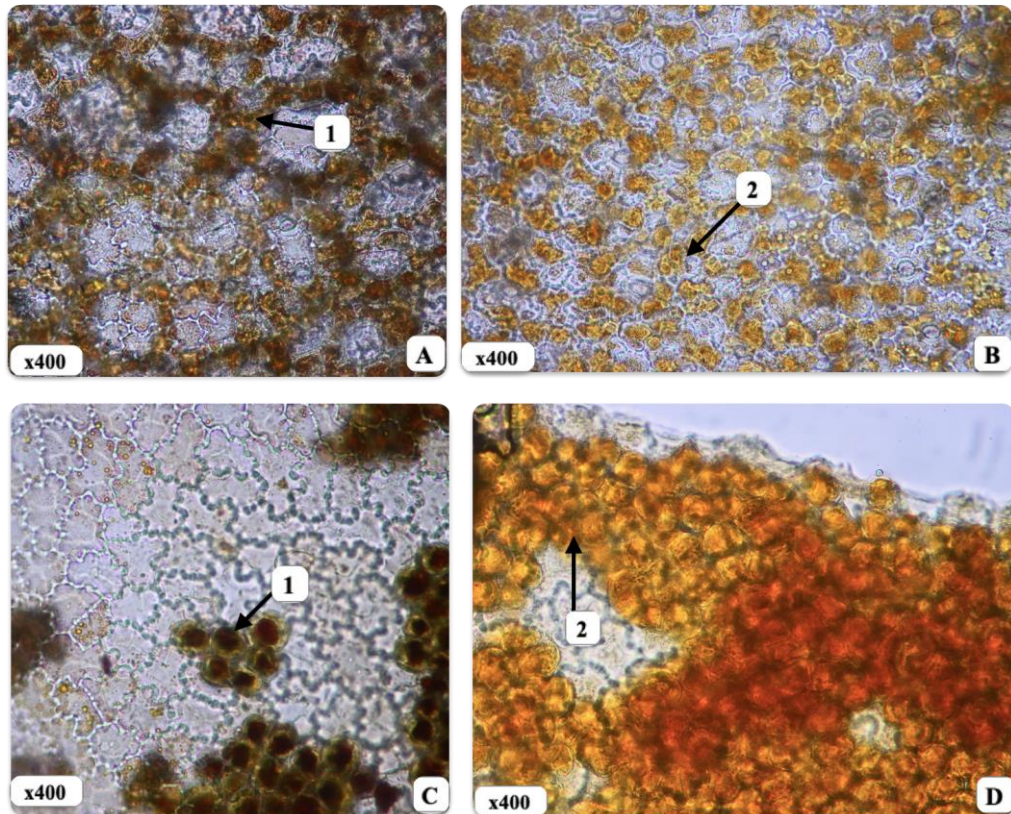


Рис. 3.21 Ідентифікація арбутину в нижній А,В та верхній С,Д епідермі листка *Ch. umbellata*: А,С – до реакції, В,Д – результат реакції. 1. – клітини мезофілу нижньої та верхньої епідерми до реакції, 2 – результат реакції з розведеною нітратною кислотою.

Для поперечного перерізу стебла арбутин прослідковувався у коровій паренхімі перидерми, луб'яній паренхімі та луб'яних волокнах флоєми а також у зовнішньому шарі основної паренхіми серцевини та наявними окремими клітинами-ідіобластами в центрі серцевини (Рис. 3.23. А-Д).

Для встановлення клітин з лігніфікованими оболонками було використано флороглюцин з концентрованою хлористоводневою кислотою під дією яких здерев'янілі оболонки набули яскраво-малинового забарвлення. На поперечному перерізі це шар деревини (Рис. 3.24. А-Д).

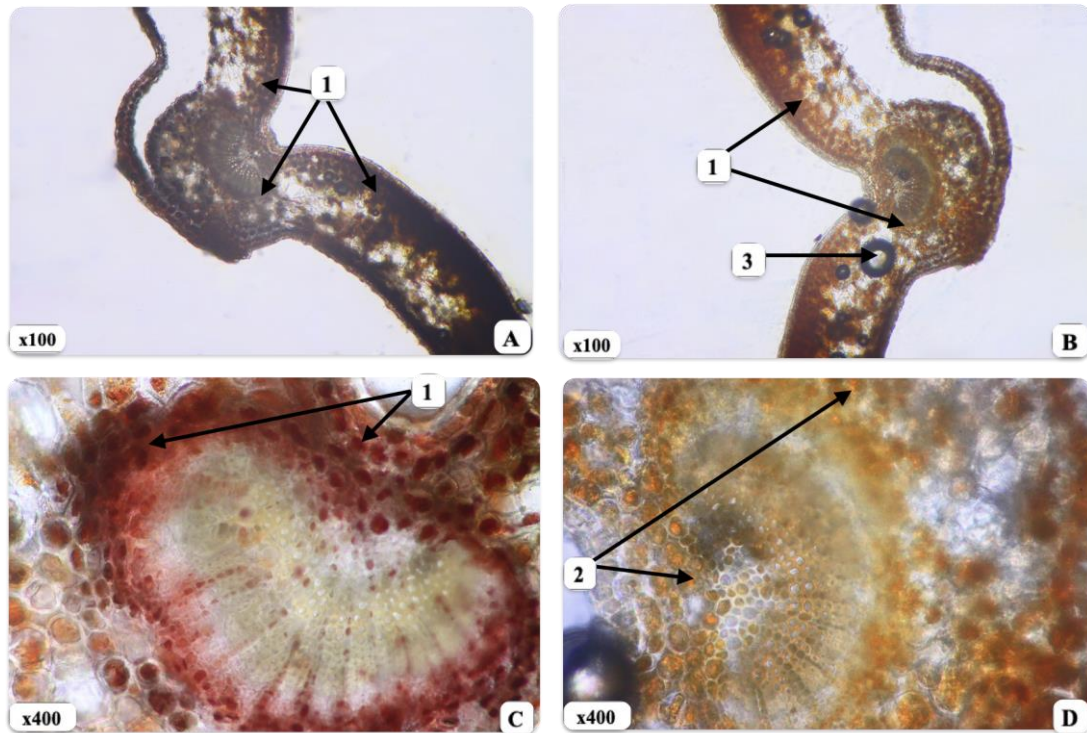


Рис. 3.22 Концентрація арбутину на поперечному перерізі листка *Ch. umbellata*: A,C – до реакції, B,D – результат реакції. 1. – мезофіл до реакції, 2 – результат реакції з нітратною кислотою, 3 – виділення пухирців газу внаслідок інтенсивного проходження реакції

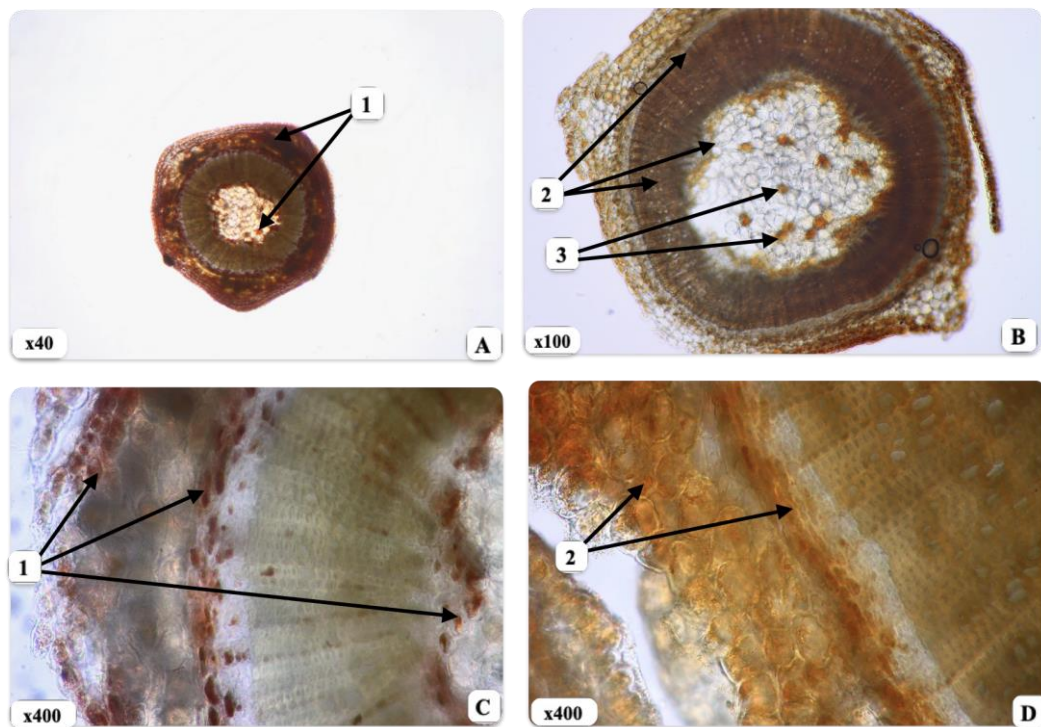


Рис. 3.23 Встановлення місць накопичення арбутину на поперечному перерізі стебла *Ch. umbellata*: 1 – місця потенційної концентрації арбутину, 2 – результат реакції з нітратною кислотою, 3 – клітина-ідіобласт з арбутином

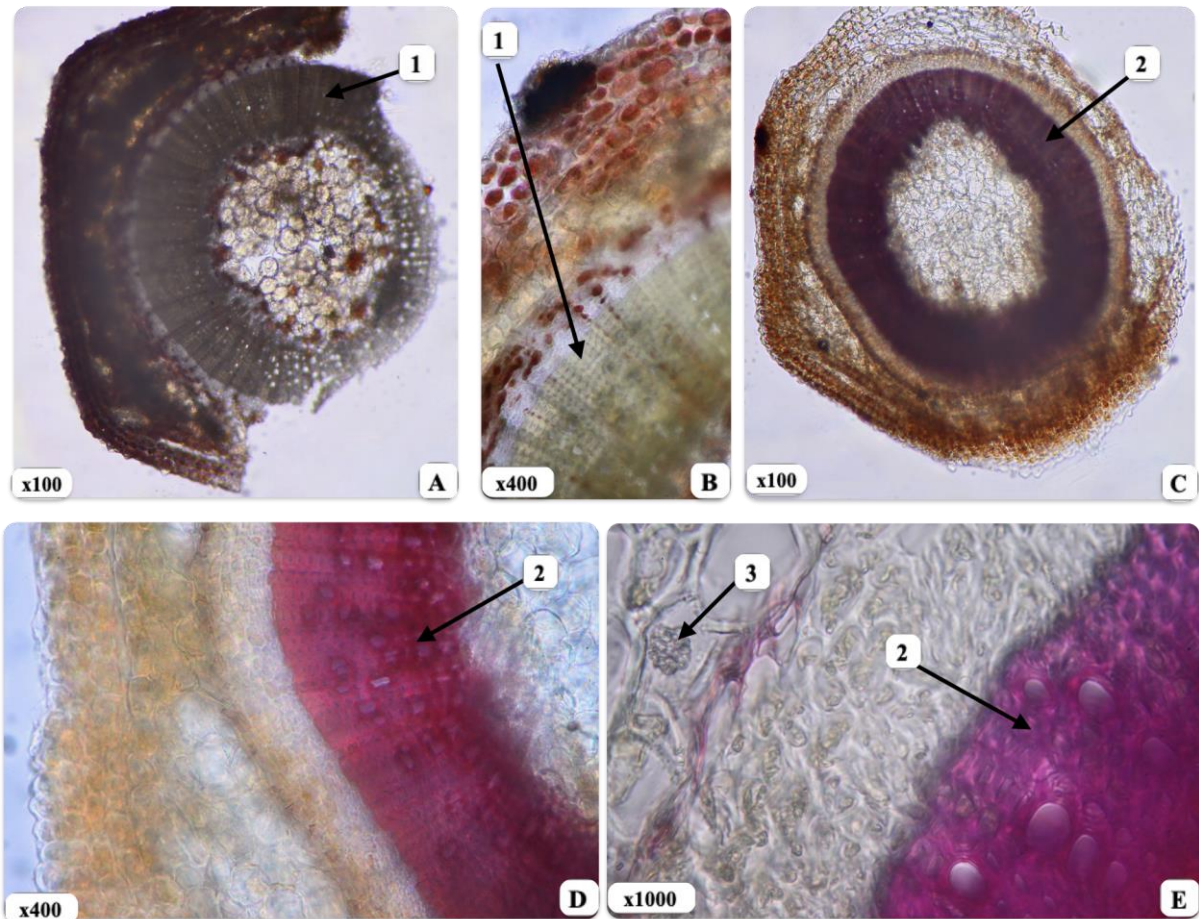


Рис. 3.24 Виявлення місць здерев'яніння на поперечному перерізі стебла *Ch. umbellata*: 1 – місця потенційної концентрації здерев'янілих клітин, 2 – результат реакції з флороглюцином та HCl, 3 – друза (Рис.3.22. А-D)

3.6 Визначення параметрів стандартизації трави зимолубки зонтичної

За результатами отриманих експериментальних даних та у відповідності до вимог ДФУ запропоновані наступні показники якості зимолубки зонтичної трави (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Показники якості зимолюбки зонтичної трави

Показник	Нормування	Серія 0011	Серія 0012	Серія 0013
Макроскопія (Зовнішні ознаки)	Цільна сировина. Листок шкірястий зверху темно-зеленого, знизу світлого кольору, подовженої або яйцеподібної форми, край пильчастий; стебло ребристе; квітки рожевого кольору зібрані в зонтикоподібне суцвіття на досить довгих ніжках. Запах відсутній. Подрібнена сировина. Фрагменти листків різної форми, колір зверху темно-зелений, знизу світлий, ребристого стебла, квіток рожевого кольору.	Відповідає		
Мікроскопія	Листок <i>Chimaphilla umbellata</i> дорзовентральний, гіпостоматичний. На поверхні, як адаксіальної так і абаксіальної епідерми виражено залягають шари кутину, наявність якого підтвердили і гістохімічні реакції.	Відповідає		

Продовж. табл. 3.5

Показник	Нормування	Серія 0011	Серія 0012	Серія 0013
	Тип анатомічної будови стебла – безпучковий. Стебло вкрите перидермою з неоднорідним верхнім рядом клітин, залишків епідерми, зовнішня поверхня якої має добре розвинений кутикулярний шар, типовий для ксерофільних рослин, з бородавчастими, сосочкоподібними трихомами. Проведені гістохімічні реакції з сировиною трави зимолубки зонтичної свідчать про наявність таких біологічно активних речовин як: арбутин, таніни, ліпіди, воскоподібні речовини (кутин), лігнін.			
Ідентифікація діючих речовин методом ТШХ: флавоноїдів (система розчинників кислота мурашина безводна P – вода P – етилацетат P (1:1:8))	На хроматограмі досліджуваного розчину з'являлись оранжева зона гіперозиду і оранжево-жовта зона рутину	Відповідає		

Продовж. табл. 3.5

Показник	Нормування	Серія 0011	Серія 0012	Серія 0013
Важкі метали Арсен Кадмій Свинець Ртуть	не більше 0.009 % (90.0 ppm) не більше 0.0004 % (4.0 ppm) не більше 0.0005% (5.0 ppm) не більше 0.00001% (0.1 ppm)	Відповідає		
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10,00 %	7,15±0,11	8,53±0,18	8,74±0,15
Загальна зола	Не більше 5,00 %	2,90±0,10	3,11±0,12	3,05±0,14
Зола не розчинна у хлористоводневій кислоті	Не більше 2,5 %	1,10±0,12	1,26±0,15	1,18±0,14
Мікробіологічна чистота	Не більше 104 загальної кількості життєздатних бактерій (КОЕ г/мл); не більше 102 загальної кількості життєздатних грибів (КОЕ г/мл); відсутність бактерій родини Enterobacteriaceae, S. aureus, P. aeruginosa	Відповідає		
Сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид	Не менше 1,0 %	1,99±0,05	2,03±0,07	1,87±0,07

Висновки до розділу 3

1. Методом ВЕТШХ визначений якісний склад фенольних сполук трави зимолюбки зонтичної та ідентифіковано, у порівнянні із зонами стандартів, гіперозид (R_f 0.41), авікулярин (R_f 0.67), ізокверцетин (R_f 0.45), галову (R_f 0.81), кофейну кислоти (R_f 0.87).
2. Методом ВЕРХ буди ідентифіковані та кількісно визначені 8 фенольних сполук – апігенін, гіперозид, кверцитрин, рутин, кверцетин, галова кислота, гуаяверин та ізокверцетин. У найбільших кількостях містились рутин ($4,16 \pm 0,07$ %), гуаяверин ($3,99 \pm 0,08$ %) та гіперозид ($3,71 \pm 0,06$ %).
3. Досліджено кількісний вміст амінокислот у траві зимолюбки зонтичної методом газової хромато-мас-спектроскопії. Було ідентифіковано вміст 7 амінокислот, з яких 3 є незамінними – L-валін, ізолейцин, L-лейцин. У найбільшій кількості міститься L-глутамінова кислота (14,469 мкг/г), у найменшій – L-лейцин (0,050 мкг/г).
4. Методом ГХ-МС у траві зимолюбки зонтичної визначено 21 речовину, що переганяється з водяною парою. Був встановлений вміст спиртів (гексанол-3, октанол-3), альдегідів, ацеталів і кетонів (гексаналь, октанон-3, гексагідрофарнезилацетон), терпеноїди (β -бурбонен, β -елемен, α -селінен, γ -кадінен, каламенен, дигідроактинідіолід, спатуленол, каріофіленоксид), алканів (тетрадекан), похідних ароматичних карбонових кислот (фталат), фенольних сполук (флавіон), алканів (гептакозан, нонакозан), алкадієнів (1,21-докозадієн), фітостеринів (γ -ситостерол).
5. Досліджено вміст макро- та мікроелементів у траві зимолюбки зонтичної методом атомно-емісійної спектрографії. Серед елементів з найбільшим вмістом (мкг/100г) слід відзначити натрій (862,00), калій (1368,00), сіліцій (420,00), магній (231,00), фосфор (125,00); серед мікроелементів: кальцій (530,00), манган (18,00), ферум (9,00).
6. Досліджено мікроскопічні діагностичні ознаки трави зимолюбки зонтичної. Листок *Chimaphilla umbellata* дорзовентральний, гіпостоматичний. На

поверхні, як адаксіальної так і абаксіальної епідерми виражено залягають шари кутину, наявність якого підтвердили і гістохімічні реакції. Тип анатомічної будови стебла – безпучковий. Стебло вкрите перидермою з неоднорідним верхнім рядом клітин, залишків епідерми, зовнішня поверхня якої має добре розвинений кутикулярний шар, типовий для ксерофільних рослин, з бородавчастими, сосочкоподібними трихомами. Проведені гістохімічні реакції з сировиною трави зимолубки зонтичної свідчать про наявність таких біологічно активних речовин як: арбутин, таніни, ліпіди, воскоподібні речовини (кутин), лігнін.

7. Визначені параметри стандартизації трави зимолубки зонтичної: макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, ідентифікація методом ТІХ (визначення флавоноїдів – рутину та гіперозиду), визначення вмісту важких металів, втрата в масі при висушуванні (не більше 10 %), зола загальна (не більше 5 %), зола, не розчинна в кислоті хлористоводневій (не більше 2,5 %), мікробіологічна чистота, сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (не менше 1,0 %).

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у таких публікаціях:

1. Kovregin O., Prokopiuk V., Lytkin D., Vladymyrova I. Study of the influence of the extract of pipsissewa on cell cultures. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 3(49). P. 78-85. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.307291
2. Kovregin O., Lytkin D., Mykhailenko O., Ivanauskas L., Yudkevych T., Vladymyrova I., Khodak L., Starikov V. Study of phenolic compounds of umbellate wintergreen herb and their influence on biochemical indicators of blood and urine in the rat model of chronic kidney disease. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 4(50). P. 44-52. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.310744
3. Kovregin O., Laryanovska Y., Yudkevych T., Lytkin D., Lebedinets I., Vladymyrova I. Investigation of the influence of the extract of the herb of umbellate wintergreen on the structural and functional state of the kidneys of

- rats. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 5(51). P. 89-95. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.314121
4. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Вивчення амінокислотного складу трави зимоліюбки зонтичної (*Chimaphila umbellata* L.). *Фармацевтичний журнал*. 2024. Т. 79, № 4. С. 63-71. DOI: 10.32352/0367-3057.4.24.06
 5. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Ідентифікація фенольних сполук зимоліюбки зонтичної методом високоефективної тонкошарової хроматографії. *Health&Education*. 2024. № 3. С. 58-63. DOI: 10.32782/health-2024.3.7
 6. Коврегін О., Махія Л., Владимірова І. Мікроскопічні та гістохімічні дослідження трави зимоліюбки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* (L.) W. Barton). *Фітоterapia. Часопис*. 2024. № 4. С. 224–231. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-4-224
 7. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення мінерального складу зимоліюбки зонтичної трави. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали V Міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 23-25 листоп. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 73-74.
 8. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення показників якості зимоліюбки зонтичної трави. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXIX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 46-47.
 9. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимоліюбка зонтична як перспективний вид лікарської рослинної сировини. *Youth Pharmacy Science* : матеріали II Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 груд. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 61-62.
 10. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимоліюбка зонтична: лікувальні властивості та застосування у медицині. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 42.

РОЗДІЛ 4

**ОДЕРЖАННЯ ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ ТРАВИ ЕКСТРАКТУ
РІДКОГО, ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ТА
ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ. ОДЕРЖАННЯ ТА
СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТАБЛЕТОК З ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ
ЕКСТРАКТОМ**

4.1 Визначення показників якості та технологічних параметрів трави зимолюбки зонтичної

За вимогами ДФУ, для трави зимолюбки зонтичної визначені числові показники – втрата в масі при висушуванні, зола загальна, зола, не розчинна у кислоті хлористоводневій, вміст сторонніх домішок (табл. 4.1) [21].

Таблиця 4.1

Результати визначення показників якості сировини

Найменування параметра	Значення
Втрата в масі при висушуванні, %	7,15±0,11
Загальна зола, %	2,90±0,10
Зола, не розчинна у хлористоводневій кислоті, %	1,10±0,12
Вміст сторонніх домішок, %	3,89±0,18

З метою визначення параметрів для процесу екстрагування були визначені технологічні параметри трави зимолюбки зонтичної: ступінь подрібнення сировини; питома поверхня часток сировини; поглинання сировиною екстрагента; питома, об'ємна та насипна маси, пористість і нарізність, вільний об'єм шару сировини.

Ступінь подрібнення сировини характеризується розміром часток, ступенем руйнації тканин і поверхнею екстрагування, необхідних для

визначення оцінки якості підготовки сировини до екстракції та при розрахунку констант масопередачі.

Питома, об'ємна та насипна маси, пористість і нарізність дозволяють визначити об'єм, який займає суха і набухла сировина, необхідні співвідношення сировини та екстрагента та вибрати те чи інше обладнання для проведення процесів подрібнення, екстрагування, транспортування та ін.

Результати проведених досліджень ЛРС, що використана для одержання сухих екстрактів, представлені в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Результати визначення технологічних параметрів сировини та вмісту екстрактивних речовин

Найменування параметра	Значення
Середній розмір часток сировини, мм	8,12±0,21
Питома густина, г/см ³	1,31±0,10
Об'ємна густина, г/см ³	0,56±0,06
Насипна густина, г/см ³	0,39±0,02
Пористість сировини	0,57±0,04
Нарізність шару	0,32±0,05
Вільний об'єм шару	0,71±0,06
Коефіцієнт поглинання екстрагенту	
Вода очищена	2,11±0,10
10 %-вий етанол	2,01±0,12
30 %-вий етанол	2,15±0,12
50 %-вий етанол	2,23±0,11
70 %-вий етанол	2,19±0,13
96 %-вий етанол	1,98±0,12
Вміст екстрактивних речовин, %	
Вода очищена	23,12±1,04

10 %-вий етанол	25,26±1,11
30 %-вий етанол	26,12±1,06
50 %-вий етанол	29,11±1,02
70 %-вий етанол	27,05±1,11
96 %-вий етанол	21,14±1,13

Найбільший вихід екстрактивних речовин з трави зимолубки зонтичної визначений при екстрагуванні трави 50 % етанолом ($29,11 \pm 1,02$ %) та 70 % етанолом ($27,05 \pm 1,11$ %). У найменшій кількості екстрактивні речовини вилучались водою ($23,12 \pm 1,04$ %) та 96 % етанолом ($21,14 \pm 1,13$ %).

Для подальших досліджень з одержання рідкого екстракту запропоновано використовувати 50 % етанол в якості екстрагента.

Важливим аспектом при екстрагуванні також є визначення співвідношення сировина : екстрагент. Результати наведені на рис. 4.1.

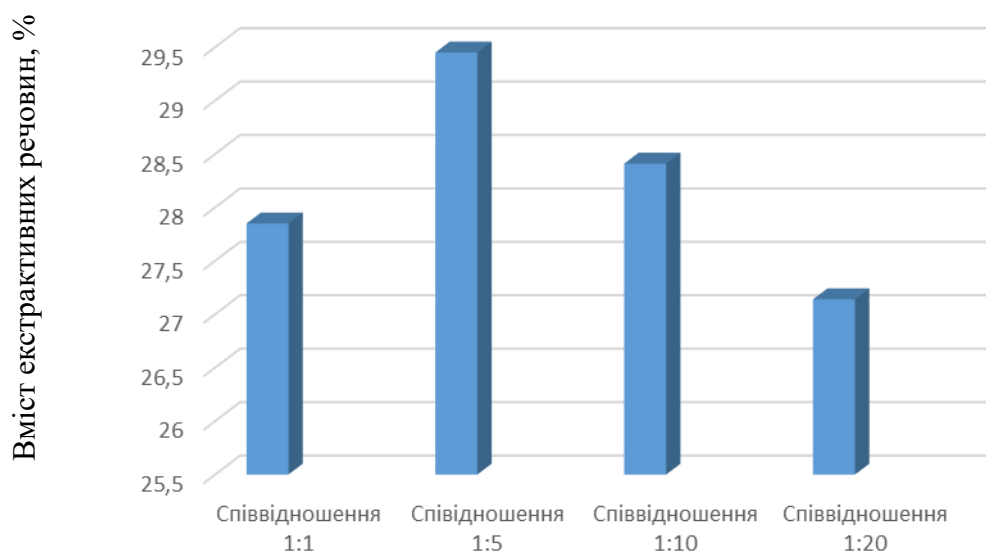


Рис. 4.1 Залежність виходу БАР від співвідношення сировина – екстрагент (50 % етанол)

За результатами експериментальних даних, оптимальним співвідношенням сировина : екстрагент запропоновано 1:5.

4.2 Отримання рідкого екстракту зимолюбки зонтичної

Отримання екстракту зимолюбки проводили на базі ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС»» (м. Харків). Екстракт зимолюбки (ЕЗ) отримували 50 %-вим етанолом за нижчезазначеними стадіями.

Стадія підготовки виробництва складалась з підготовки приміщень, обладнання та устаткування, персоналу, перевірки необхідної документації. Санітарну підготовку виробництва проводять у відповідності з СТП «Санітарна підготовка виробництва та персоналу».

Стадія 1 «Подрібнення сировини» починалась з перевірки та підготовки до роботи подрібнювачів. Кожна (серія) партія трави зимолюбки лікарської, що надходила у виробництво, незалежно від наявності сертифікату якості постачальника, підлягала перевірці у контрольно-аналітичній лабораторії на відповідність вимогам діючої нормативної документації. Сировина використовувалась у виробництві при одержанні від контрольно-аналітичної лабораторії аналітичного паспорту, що підтверджувало її якість.

На *стадії 2 «Приготування екстрагенту»* готували етанол 50 % з етанолу ректифікованого, води очищеної, що пройшли вихідний контроль у відповідності з вимогами діючої АНД, а також додавали етанол-відгін 50 %, який був одержаний на *стадії 6 «Регенерація екстрагенту»* даного виробництва. З мірників самопливом подавали розраховану кількість етанолу ректифікованого та води очищеної у збірник. Екстрагент перемішували протягом 15-20 хв та відбирали пробу для визначення об'ємної долі етанолу у етанольно-водному розчині, яка мала бути 50 %. При необхідності проводили корекцію екстрагенту етанолом або водою очищеною. Одержаний екстрагент передавали на *стадію 3*.

На *стадії 3 «Настоювання та екстрагування»* подрібнену рослинну сировину завантажували у екстрактор, на дно якого вкладали обшите бавовняною тканиною «несправжнє днище». Рослинну сировину рівномірно розподіляли у середині перколятора та укладали з достатньою щільністю. Зі збірника для приготування екстрагенту самопливом подавали етанол 50 % до

одержання «дзеркала» й залишали для настоювання на 24 год при температурі 18-25 °С. По закінченні часу настоювання самопливом зливали перший екстракт у реактор для відстоювання. Потім закривали нижній злив і самопливом подавали другу порцію екстрагенту і проводили екстракцію протягом 24 год при температурі 18-25 °С. Через вказаний час зливали другий екстракт у реактор для відстоювання. Після другої екстракції кран нижнього зливу залишали відкритим і давали можливість максимально стекти екстракту. Одержаний екстракт передавали на *стадію 4 «Відстоювання»*. Відпрацьований шрот, що містить залишки екстрагенту залишали в екстракторі для регенерації екстрагенту на *стадії 9*.

На *стадії 4 «Відстоювання»* екстракт відстоювали у реакторі, що мав хладонову оболонку для охолодження. Екстракт відстоювали протягом 48 год при температурі 10 ± 2 °С, яку контролювали термометром. Після закінчення процесу відстоювання екстракт самопливом подавали на *стадію 5 «Фільтрація»*.

На *стадії 5 «Фільтрація»* за допомогою насосу екстракт подавали на нутч-фільтр. Після фільтрації відбирали пробу для аналізу і проводили контроль готової продукції (екстракту).

На даному виробництві з метою раціонального використання сировини на *стадії 6* проводили регенерацію залишків екстрагенту зі шроту рослинної сировини. У процесі екстракції рослинний матеріал набухав, поглинаючи від однієї до трьох частин екстрагенту. Тому доцільно вводити стадію регенерації, на якій в середньому у виробництво повертається до 50 % екстрагенту, що залишається у шроті.

Етанол-відгін, одержаний на *стадії 6 «Регенерація екстрагенту»*, передавали на *стадію 2 «Приготування екстрагенту»* даного виробництва.

Блок-схема технологічного процесу виробництва зимолюбки зонтичної екстракту рідкого наведена на рис. 4.2.

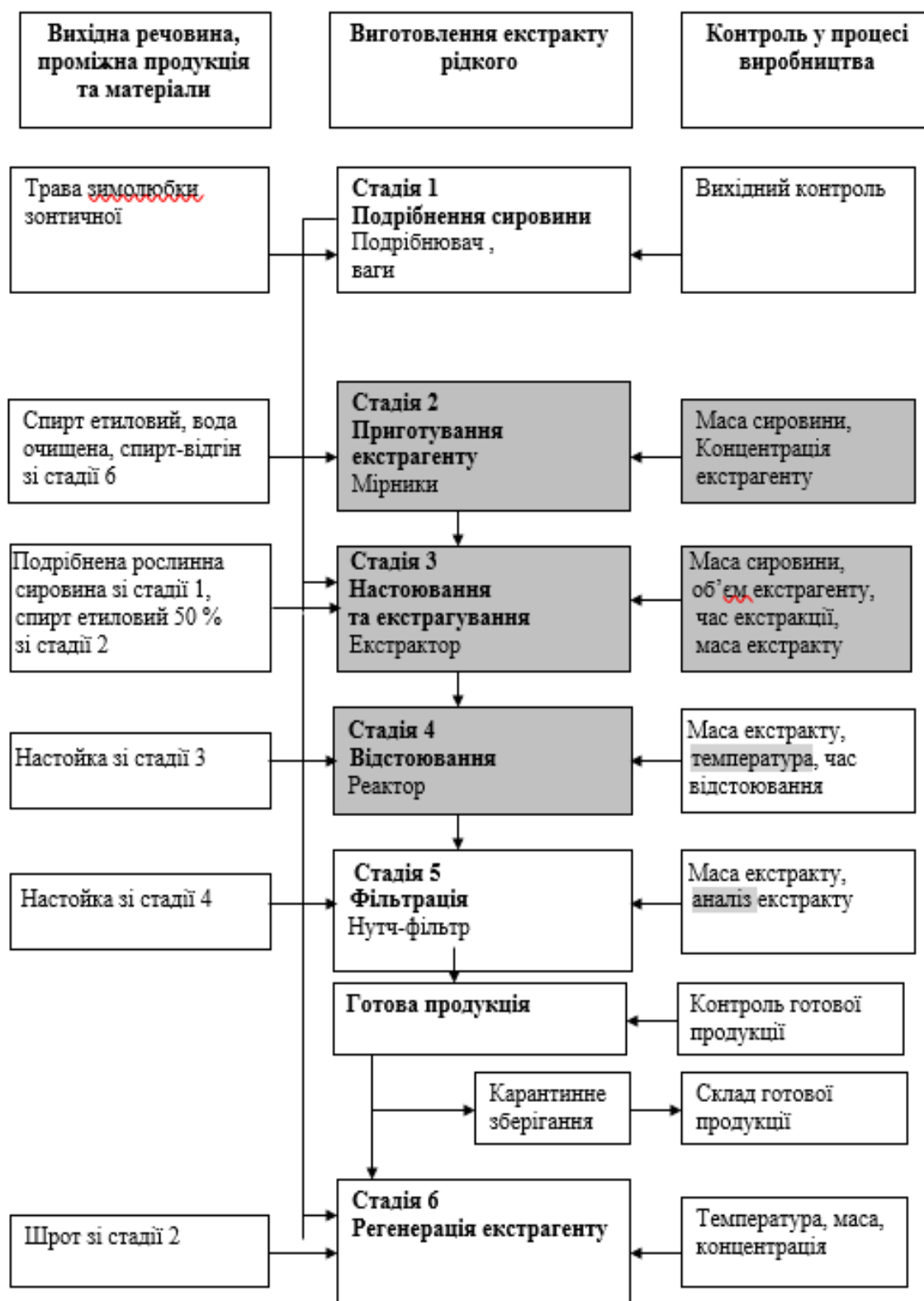


Рис. 4.2. Блок-схема технологічного процесу виробництва зимоліубки зонтичної екстракту рідкого

4.3 Визначення параметрів стандартизації рідкого екстракту трави зимоліюбки зонтичної

Стандартизацію отриманого рідкого екстракту зимоліюбки трави зонтичної проводили згідно з вимогами монографії “Екстракти” (ДФУ 2.0 Т1) та визначаючи параметри стандартизації для трьох серій. Органолептичні та фізико-хімічні показники (опис, ідентифікація (2.2.7), масова частка сухих речовин або сухий залишок (2.4.16), вміст етанолу, важкі метали (2.4.8, метод А), мікробіологічна чистота (5.1.4, 2.6.12, 2.6.13) вміст діючих речовин (суми флавоноїдів у перерахунку на рутин)) визначали за загальновідомими методиками [11]. Результати наведені в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Показники якості рідкого екстракту зимоліюбки зонтичної трави

Досліджуваний показник	Серія 001	Серія 002	Серія 003
Опис	Прозора рідина коричневого кольору зі специфічним приємним запахом та гіркуватим смаком		
Ідентифікація діючих речовин методом ТШХ: флавоноїдів (система розчинників кислота мурашина безводна P – вода P – етилацетат P (1:1:8))	На хроматограмі досліджуваного розчину з'являлись оранжева зона гіперозиду і оранжево-жовта зона рутину		
Важкі метали, не більше 0,002 %	Відповідає		
Сухий залишок, %	26,52±0,12	26,03±0,14	26,14±0,12
Вміст етанолу, %	48,32±2,45	49,11±2,78	48,58±2,65
Мікробіологічна чистота	Відповідає		
Сума флавоноїдів, не менше 1,5 %	2,10±0,07	2,45±0,04	2,39±0,06

4.4 Дослідження фармакологічних властивостей екстракту трави зимолюбки зонтичної

4.4.1 Дослідження впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної на культуру клітин

Проведення досліджень впливу екстракту зимолюбки на клітинні культури проводилось у два етапи (рис. 4.3). На першому етапі було визначено мінімальну токсичну концентрацію, при якій клітини зберігають свою життєздатність; контроль проводився за морфологічними ознаками клітин. На другому етапі оцінювали вплив екстракту зимолюбки на різні функції клітини.

Відповідно до етапів планування експерименту, на першому етапі дослідження було проведене культивування клітин в 24 лунковому планшеті з ЕЗ в концентраціях 5; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,02%. Макроскопічно високі концентрації змінювали колір середовища культивування (рис. 4.4).

При мікроскопічному дослідженні після розморожування клітини на 2-гу добу формували моношар та мали типову для лінії L929 форму, яку зберігали протягом доби. При додаванні ЕЗ в концентрації 0,05% та вище спостерігали повне відшарування клітин протягом 24 год, яке починалося через 3 год (рис. 4.5). В концентрації 0,02% спостерігали часткове збереження моношару клітин та велику кількість відшарованих клітин. Враховуючи отримані дані, було вирішено для подальшого дослідження застосовувати концентрації 0,05; 0,02, 0,01; 0,005% екстракту.

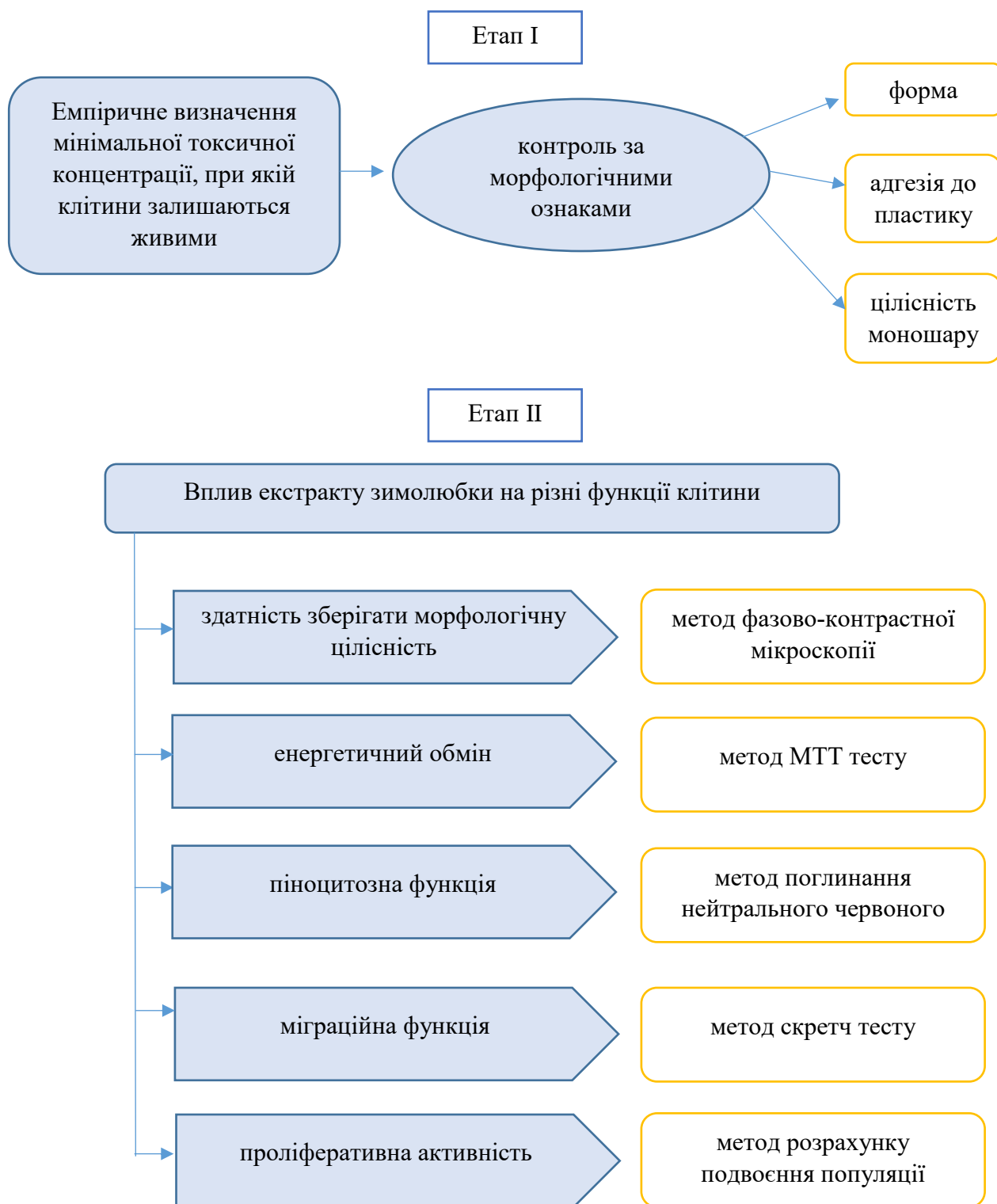


Рис. 4.3 Етапи планування та дизайн експерименту



Рис. 4.4 Макроскопічне дослідження культур клітин з ЕЗ

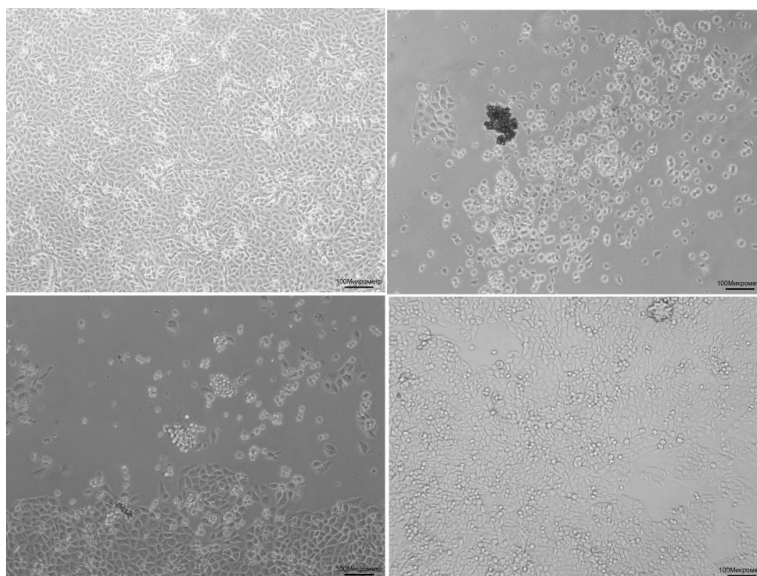


Рис. 4.5 Мікроскопічне дослідження культури L929 після культивування з ЕЗ. Масштабні лінійки 100 мкм

Після проведення реакції МТТ мікроскопічно було підтверджено перехід МТТ в формазан у негативному контролі (нативні клітини), при концентраціях ЕЗ 0,01% та нижче та відсутність реакції у позитивному контролі (клітини, вбиті етанолом) при концентраціях ЕЗ вище 0,02% (рис. 4.6).

При реєстрації показників реакції МТТ визначено, що ЕЗ в концентрації 0,02% та вище різко пригнічує активність мітохондрій, незважаючи на часткову збереженість адгезії клітин, зниження концентрації в два рази вже не впливає на мітохондрії (рис. 4.7).

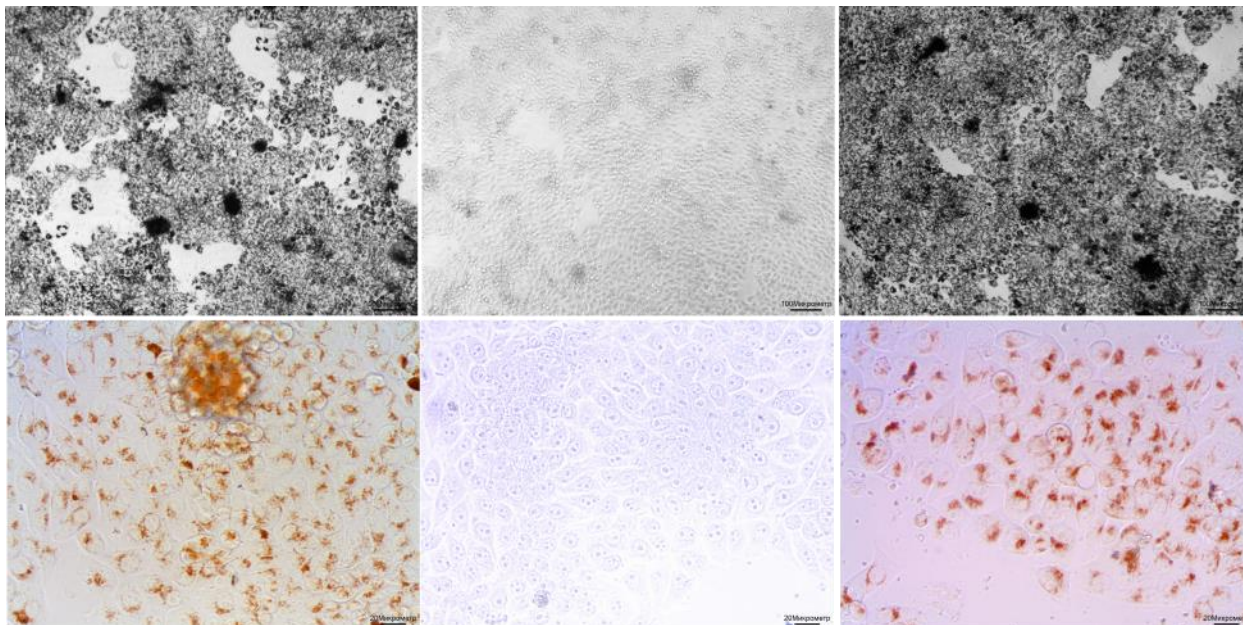


Рис. 4.6 Мікроскопічне дослідження культури L929 після культивування з ЕЗ та проведення тестів МТТ та поглинання НЧ. Масштабні лінійки 100 мкм (верхній рядок) та 20 мкм (нижчий рядок)

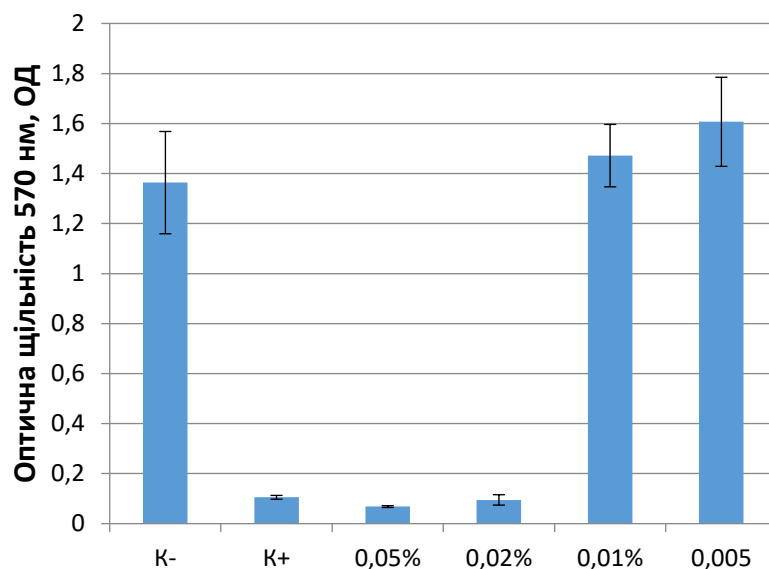


Рис. 4.7 Показники реакції МТТ клітин після культивування з ЕЗ

Після проведення реакції поглинання НЧ мікроскопічно було підтверджено поглинання НЧ в негативному контролі (нативні клітини), при концентраціях ЕЗ 0,01 % та нижче та відсутність реакції в позитивному контролі (клітини, вбиті етанолом) при концентраціях ЕЗ вище 0,02 % (рис. 4.7).

При реєстрації показників реакції поглинання НЧ визначено, що ЕЗ в концентрації 0,02 % та вище різко пригнічує піноцитозна активність, незважаючи на часткову збереженість адгезії клітин, зниження концентрації в два рази вже не впливає на мітохондрії (рис. 4.8).

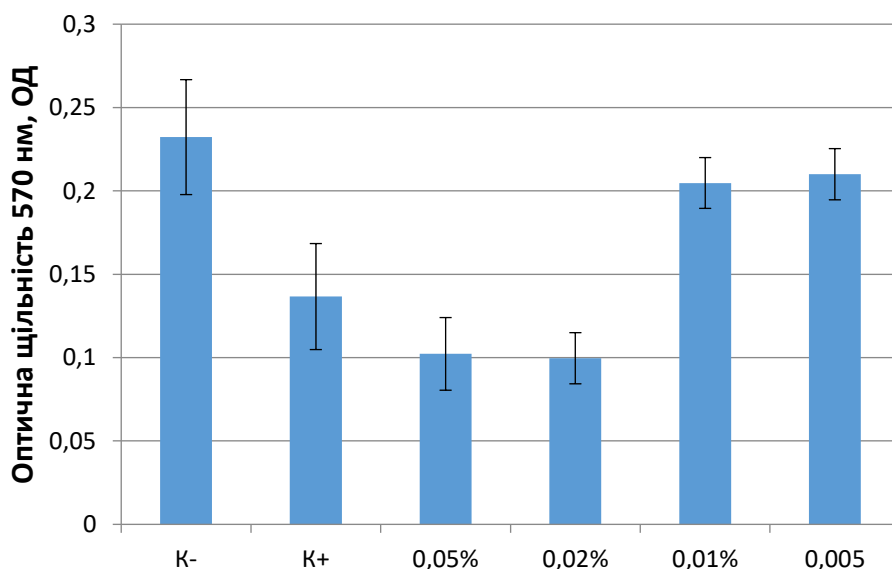


Рис. 4.8 Показники реакції поглинання НЧ клітинами після культивування з зимолюбки екстрактом

При проведенні скретч-тесту, який характеризує здатність клітин до міграції продемонстровано, що у контрольному зразку з нативними клітинами, та у зразку з клітинами в концентрації 0,01% та 0,005% ЕЗ з часом клітини мігрували, втім як у вищих концентраціях через втрату моношару визначити показними не вдалося (рис. 4.9). Продemonстровано, що концентрація ЕЗ 0,01 % знижує міграційні показники, а при концентрації 0,005 % різниці з контрольним значеннями не виявлено (рис. 4.10).

При вивченні проліферативної активності клітин за методом розрахунку часу подвоєння популяції виявлено, що ЕЗ в концентрації 0,02 % та вище в культуральному середовищі призводить до призупинки поділу клітин. Кількість знятих клітин була значно менше від кількості посіяних. Концентрація 0,01%

знижує проліферативну активність, а при концентрації 0,005% різниці з контрольним значеннями не виявлено (рис. 4.11).

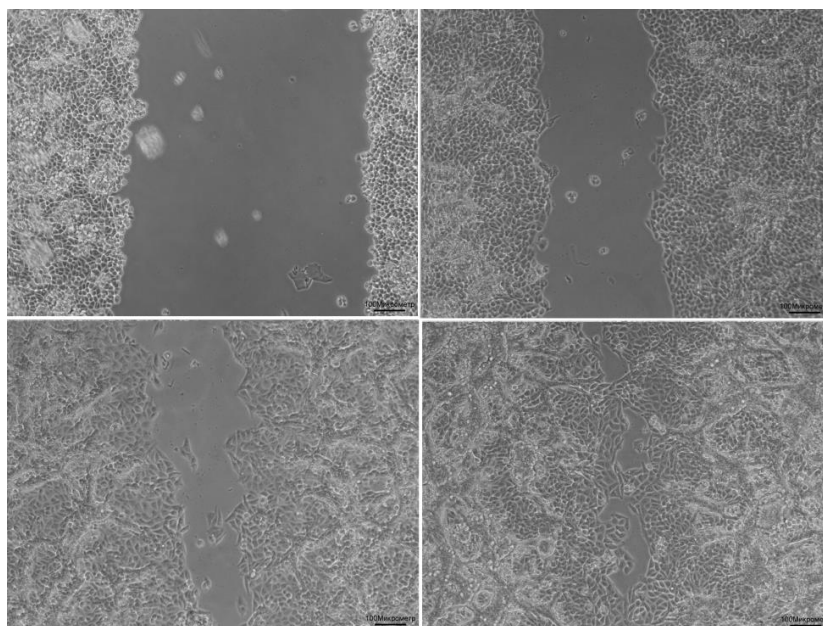


Рис. 4.9 Мікроскопічне дослідження скретч тесту (міграційна активність) культури L929 після культивування з ЕЗ. Масштабні лінійки 100 мкм (верхній рядок)

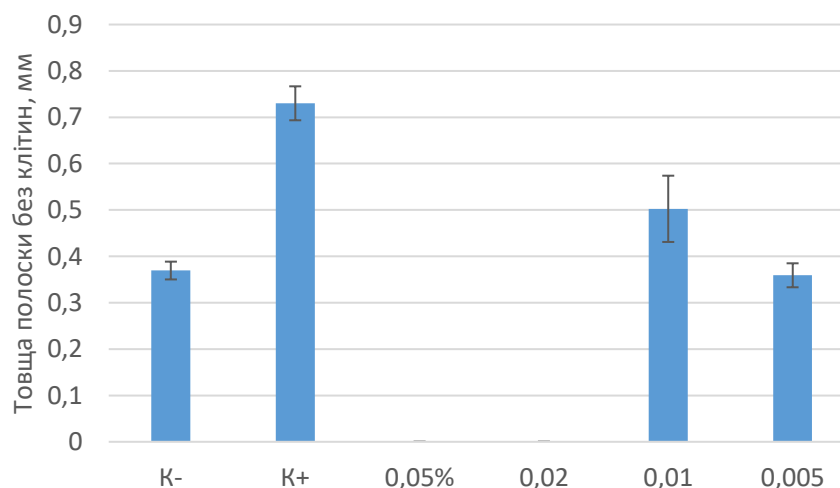


Рис. 4.10 Показники міграційної активності клітин за даними скретч тесту

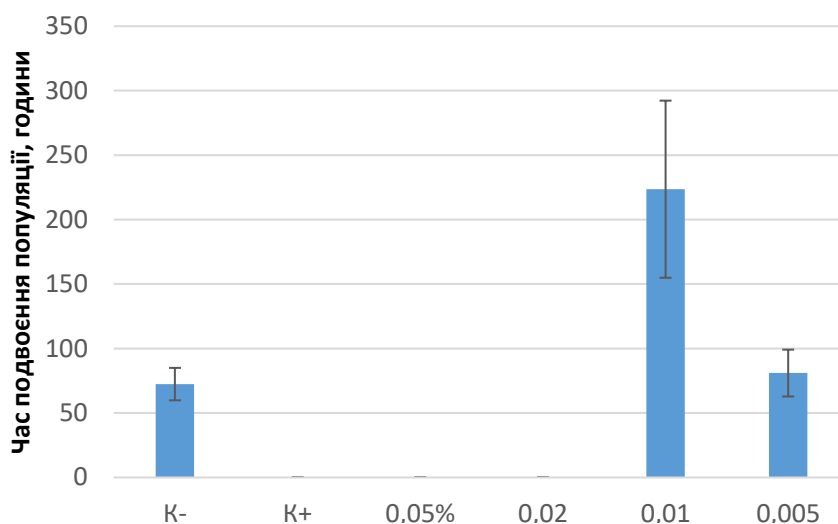


Рис. 4.11 Показники проліферативної активності клітин

За отриманими результатами, запропоновано для подальшого дослідження застосовувати концентрації 0,05; 0,02, 0,01; 0,005% екстракту зимолубки. Після проведення реакції МТТ мікроскопічно було підтверджено перехід МТТ в формаган в негативному контролі (нативні клітини), при концентраціях ЕЗ 0,01 % та нижче та відсутність реакції в позитивному контролі (клітини, вбиті етанолом) при концентраціях ЕЗ вище 0,02 %. При реєстрації показників реакції поглинання НЧ визначено, що ЕЗ в концентрації 0,02% та вище різко пригнічує піноцитозну активність, незважаючи на часткову збереженість адгезії клітин, зниження концентрації в два рази вже не впливає на мітохондрії. Концентрація 0,01 % знижує проліферативну активність, а при концентрації 0,005 % різниці з контрольним значеннями не виявлено. Тому, отримані експериментальні дані обґрунтовують можливість застосування екстракту зимолубки у фітотерапії для профілактики та лікування різних захворювань. Подальші поглиблені фармакологічні дослідження на патологічних моделях та гістохімічні дослідження спрямовуватимуться на визначення біологічних маркерів екстракту зимолубки та встановленню їх механізму дії.

При вивченні оцінки впливу екстракту зимолубки на клітинну культуру L929 встановлений токсичний вплив на дані клітини при додаванні до середовища культивування в концентрації вище 0,01 %. Токсичний вплив мав

пороговий ефект. Найбільш чутливими виявились міграційна та проліферативна функції клітини, менш чутливими – енергетична, піноцитозна та збереження морфологічної цілісності клітин.

4.4.2 Визначення антиоксидантної дії та визначення нефропротекторного впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної

В ході даного експерименту проводили вивчення активності різних рівнів доз екстракту трави зимолюбки зонтичної на моделі хронічної хвороби нирок у порівнянні з компаратором – препаратом "Леспефрил" виробництва ПАТ "Лубнифарм" (Україна), розчин для орального застосування у флаконах по 100 мл, що містить екстракт леспедези двоколірної (*Lespedeza bicolor*) із 70,8 г пагонів [17]. Детально методика проведення експерименту наведена у розділі 2.

За результатами дослідження на моделі хронічної хвороби нирок у щурів встановлено, що в групі ПК під впливом сполук хрому розвивалася виражена ниркова недостатність. Виживаність в цій групі дорівнювала 80 % (табл. 4.4).

Разом з цим діурез вірогідно зменшувався в 1,9 разів, а вміст загального білка в сечі збільшувався в 33 рази, що свідчило про значну протеїнурію ($p < 0,05$ проти НК). Крім того, погіршення функціонального стану нирок призводило до зниження виділення сечовини та креатиніну нирками й підвищення їх вмісту в сироватці крові, через що показники кліренсу креатиніну і кліренсу сечовини вірогідно зменшувалися, в 7,3 рази та в 9,8 разів відповідно відносно аналогічних показників в групі НК (табл. 4.5, табл. 4.6). Також слід зазначити, що хоча вірогідних змін індексу маси нирок не реєструвалося, але при макроскопічному огляді у тварин цієї групи вони були збільшені та мали колір «кава з молоком», на відміну від здорових нирок тварин групи НК.

Застосування референтного зразка у експериментальних тварин відзначалося нормалізацією діурезу, зменшенням вмісту загального білка сечі в 1,8 разів ($p < 0,05$ проти ПК).

**Вплив досліджуваних зразків на перебіг хромат-індукованої
нефропатії у щурів (M±SEM)**

Експериментальна група	Спонтанний добовий діурез, мл/100 г	Загальний білок в сечі, г/л	Індекс маси нирок, г/100 г (2х)	Виживаність, %
НК (n=10)	2,76±0,10	0,01±0,00	0,64±0,01	100
ПК (n=8)	1,44±0,11 ^a	0,33±0,01 ^{a, b}	0,69±0,03	80 ^a
РЗ (n=8)	2,38±0,21 ^b	0,18±0,02 ^{a, b}	0,79±0,04	80 ^a
ТЗ-1 (n=7)	1,52±0,14 ^{a, c}	0,27±0,03 ^{a, c}	0,75±0,04	70 ^a
ТЗ-2 (n=7)	2,40±0,23 ^b	0,19±0,02 ^{a, b}	0,79±0,05	70 ^a
ТЗ-3 (n=10)	2,81±0,19 ^b	0,10±0,02 ^{a, b, c}	0,76±0,06	100 ^{b, c}

Примітки:

1. а – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
2. b – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
3. c – відмінності вірогідні відносно референс-контролю (p<0,05).

Таблиця 4.5

**Кліренс креатиніну у щурів на тлі хромат-індукованої нефропатії
(M±SEM)**

Експериментальна група	Вміст креатиніну в сироватці крові, мкмоль/л	Вміст креатиніну в сечі, мкмоль/л	Кліренс креатиніну, мкл/хв/100 г
НК (n=10)	67,27±1,67	3410,77±172,46	98,71±8,22
ПК (n=8)	193,39±8,24 ^a	2658,27±104,84	13,52±1,01 ^a
РЗ (n=8)	121,65±7,91 ^{a, b}	2811,63±169,28	56,01±6,03 ^{a, b}
ТЗ-1 (n=7)	169,12±7,45 ^{a, c}	2605,69±101,13	16,67±2,23 ^{a, c}
ТЗ-2 (n=7)	125,73±12,54 ^{a, b}	2710,85±218,18	55,04±8,16 ^{a, b}
ТЗ-3 (n=10)	95,28±4,26 ^{a, b}	3083,60±446,51	86,16±10,18 ^b

Примітки:

1. а – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
2. b – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
3. c – відмінності вірогідні відносно референс-контролю (p<0,05).

**Кліренс сечовини у щурів на тлі хромат-індукованої нефропатії
(M±SEM)**

Експериментальна група	Вміст сечовини в сироватці крові, ммоль/л	Вміст сечовини в сечі, ммоль/л	Кліренс сечовини, мкл/хв/100 г
НК (n=10)	6,64±0,19 ^a	168,78±22,43	49,47±7,30
ПК (n=8)	20,41±0,78 ^a	101,19±7,24 ^a	5,06±0,76 ^a
РЗ (n=8)	13,47±0,73 ^{a, b}	125,00±17,20	16,42±3,44 ^a
ТЗ-1 (n=7)	17,95±0,68 ^{a, c}	107,33±5,46 ^a	6,30±0,56 ^a
ТЗ-2 (n=7)	13,79±0,96 ^{a, b}	120,94±5,47	15,22±2,15 ^a
ТЗ-3 (n=10)	9,47±0,47 ^{a, b, c}	133,33±10,28	27,13±2,02 ^{a, b}

Примітки:

1. а – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
2. b – відмінності вірогідні відносно негативного контролю (p<0,05);
3. c – відмінності вірогідні відносно референс-контролю (p<0,05).

Разом з цим, відзначалося статистично значуще зростання клубочкової фільтрації за показником кліренсу креатиніну в 4,1 рази та зменшення вмісту сечовини в сироватці крові 1,5 разів (без значного впливу на кліренс сечовини) у порівнянні з тваринами групи НК.

Ефект від застосування тест-зразка очікувано виявляв дозозалежність. Так в дозі 0,5 мл/кг екстракт зимолубки зонтичної взагалі не був здатен впливати на видільну функцію нирок тварин на тлі моделі хронічної ниркової недостатності. Тест-зразок в дозі 1,5 мл/кг сприяв покращенню функціонального стану нирок на рівні референтного засобу. Кращий ефект продемонструвала доза тест-зразка 3,0 мл/кг, на тлі якої відзначалося: вірогідне зростання виживаності тварин до 100% (у порівнянні з групами ПК та РЗ), нормалізація діурезу до рівня НК, значуще зменшення вмісту загального білку в сечі в 3,3 рази у порівнянні з ПК та в 1,8 разів – з РЗ. Також відзначалася практична нормалізація швидкості

клубочкової фільтрації, що виражалося у досягненні показника кліренсу креатиніну рівня фізіологічної норми ($p > 0,05$ проти НК). Крім того, помітно покращувалася азотовидільна функція нирок, що відображалося у вірогідному підвищенні кліренсу сечовини в 5,4 рази у порівнянні з нелікованими тваринами.

Застосування екстракту зимолюбки у експериментальних тварин відзначалося нормалізацією діурезу, зменшенням вмісту загального білка сечі в 1,8 разів. Ефект від застосування екстракту зимолюбки очікувано виявляв дозозалежність.

В умовах розвитку ниркової недостатності у щурів досліджений екстракт зимолюбки покращував фізичний стан тварин, зменшував їхню смертність, покращував видільну функцію нирок, нормалізував азотистий й білковий обмін, сприяв захисту структури ниркової тканини, а отже, мав позитивний вплив на перебіг нефропатії. Отже, в експериментальних дослідженнях екстракт зимолюбки мав виражену нефропротекторну й гіпоазотемічну дію і може бути перспективним засобом для лікування хронічної хвороби нирок.

4.4.3 Дослідження впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок у щурів

Дослідження з вивчення впливу засобів рослинного походження на структурно-функціональні стани органів та систем експериментальних тварин досить широко використовують на етапі доклінічного вивчення рослинних засобів [14]. Існує багатий емпіричний та експериментальний досвід застосування також і фітонірингових препаратів при лікуванні захворювань нирок і сечовидільної системи. Проте доказова база досі недостатня. Фітофармацевтичні препарати успішно використовуються для симптоматичного лікування хронічної хвороби нирок, але вони представлені в достатньо вузькому діапазоні попри ряд переваг, включно з м'яким терапевтичним ефектом і набагато меншим переліком побічних ефектів [46].

Для дослідження впливу екстракту трави зимолюбки зонтичної на структурно-функціональний стан нирок у щурів використовували нирки щурів після:

- одноразового підшкірного введення 2,5 % розчину хромату калію дозою 0,7 мл/кг у перший день експерименту – контрольна патологія;

- введення етанольного екстракту трави зимолюбки зонтичної (ЕЗЗ) дозою 3 мл/кг або референс-препарату розчину леспефрилу дозою 3 мл/кг починаючи з другого дня експерименту (після індукції ниркової недостатності) щоденно протягом 20 днів у вигляді водних розчинів, виготовлених на фізіологічному розчину.

- інтактних щурів, які отримували еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Детально методика проведення експерименту наведена у розділі 2.

За результатами дослідження [86], було визначено, що у інтактних щурів ниркові тільця звичайні за розміром, щільністю розташування у кірковій речовині. Малюнок гломерулярних капілярних петель звичайний за виразністю, клітинною насиченістю; капіляри помірно повнокровні. Просвіт капсули Шумлянського-Боумена звичайний. Дистальні та проксимальні частини каналців нефронів за розміром, формою відповідали нормі. Епітелій, що вистеляв каналці, не змінено. Ядра клітин чітко контуровувалися, апікальний відділ клітин помірно розпушено, просвіт каналців не поширено. Прямі каналці та збиральні трубочки мозкового шару не змінені. Порушень міжканалцевої строми у кірковій та у мозковій речовині не помічено (рис. 4.12).

ШК-забарвлення зрізів показало, що БМ гломерулярних капілярів не потовщено, мезангіальний простір не поширено. Не змінені щіточкова облямівка і БМ звивистих каналців нефронів (рис. 4.13).

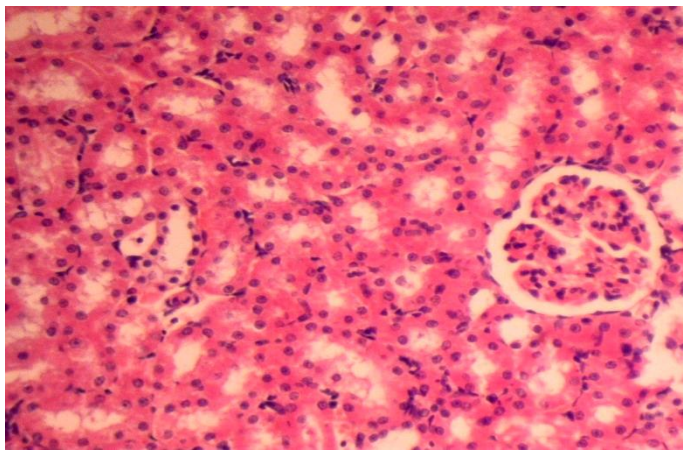


Рис. 4.12 Нирка інтактного щура. а - звичайний стан ниркового тільця та звивистих каналців. Гематоксилін-еозин. $\times 200$

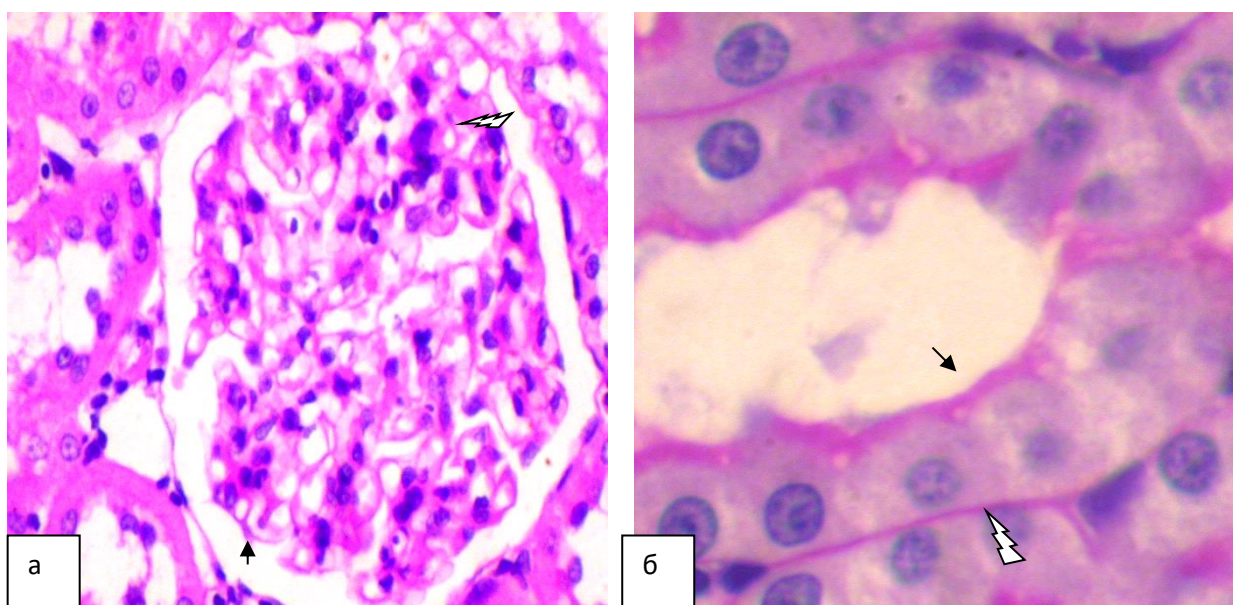


Рис. 4.13 Нирка інтактного щура. а - базальні мембрани (чорна стрілка) гломерулярних капілярів не потовщено, мезангіальний простір (біла стрілка) не поширено ($\times 400$); б – щіточкова облямівка (чорна стрілка) і базальні мембрани (біла стрілка) звивистих каналців нефронів без змін (імерсія). ШПК-реакція за Мак-Манус

Через 20 днів після підшкірного введення хрому калію у гломерулярній системі щурів групи КП виявлено багато ниркових тілець з виразною гідроектазією капсули. У частині клубочків відмічали розподіл клубочка на окремі частини (лапчатість), спадіння капілярної сітки, потовщення БМ

капілярів, розширення мезангіума з накопичення ШІК-позитивного матеріалу, проліферацію мезангіальних та епітеліальних клітин (рис. 4.14).

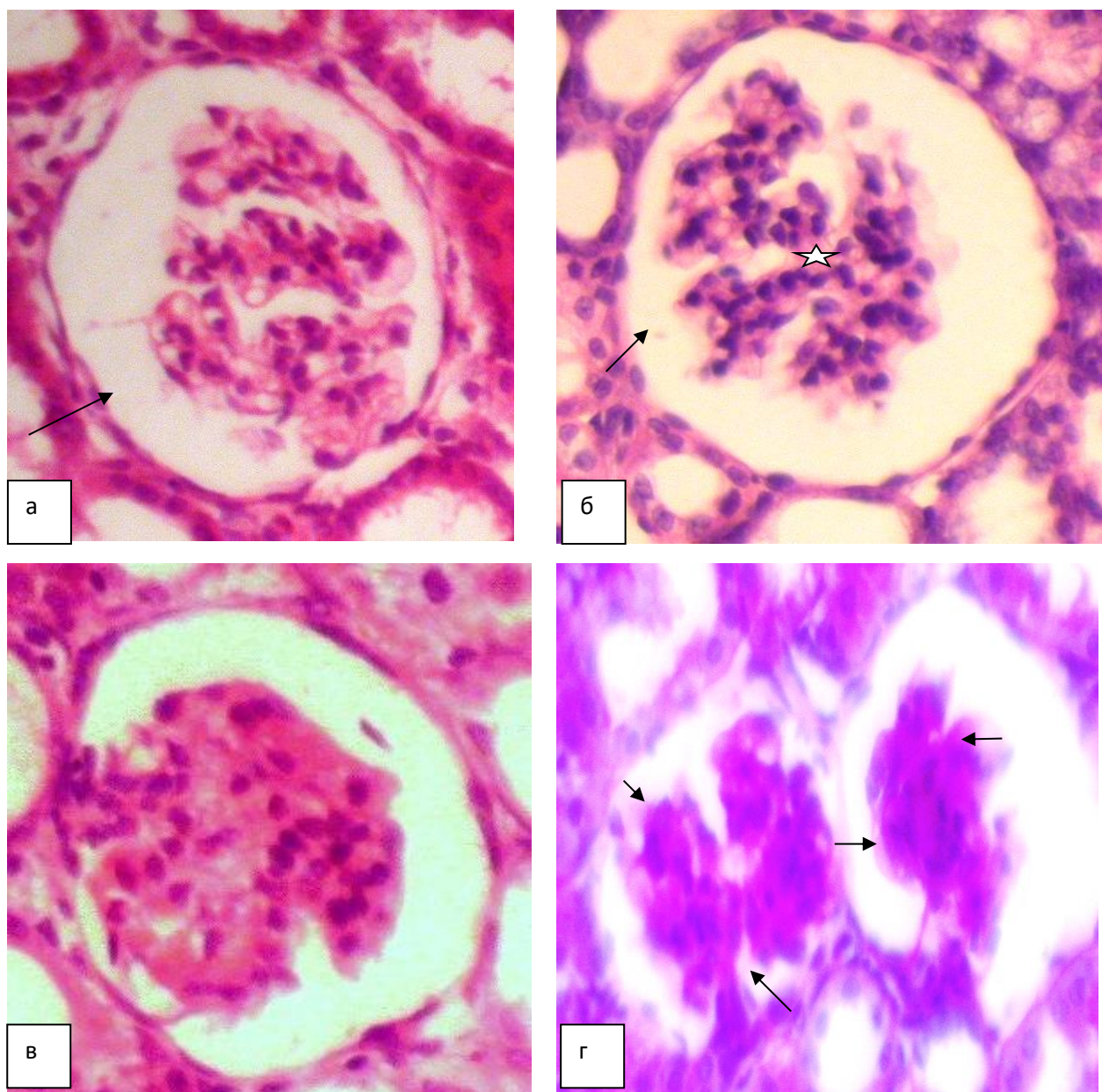


Рис. 4.14 Нирка щура після введення хромату калію: а – гідроектазія капсули Шумлянського-Боумена (стрілка),; б – лапчатість клубочка, проліферація клітин мезангіуму (зірочка); в - спадіння капілярної сітки; г - розширення мезангіуму, накопичення ШІК-позитивного матеріалу (стрілки). а-в – гематоксилін-еозин, а-б - х250, в - х400; г – ШІК-реакція за Мак-Манус, х400

У каналцевій системі значна частина каналців кіркового шару розширена – тубулогідроз різного ступеню виразності. Нефротелій сплющено, іноді у стані атрофії. У ряді каналців нефротелій частково або повністю дезорганізовано, клітини дистрофічно змінені (вакуолізація). Частина каналців містила гіалінові циліндри. Доволі часто епітелій каналців (переважно кортико-медулярної зони) набряклий, просвіт каналців не візуалізується (рис. 4.15). Базальна мембрана каналців фрагментована, щитоподібна облямівка зруйнована (рис. 4.16). Отримана мікроскопічна картина характерна для стану ниркової недостатності і підтверджується даним літератури [15].

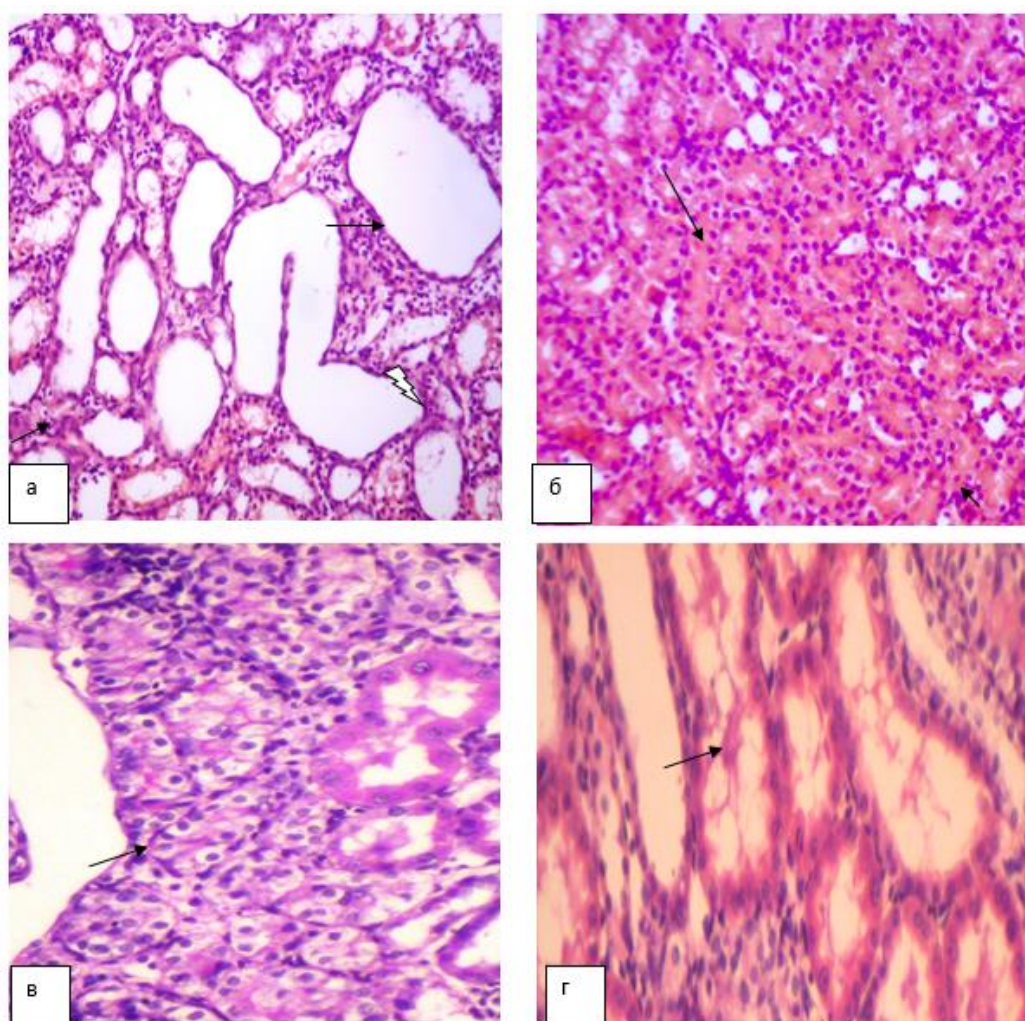


Рис. 4.15 Нирка щура після введення хромату калію: а – тубулогідроз, сплющення, атрофія епітелію (стрілки, x100),); б – набряклість епітелію, відсутність просвіту каналців (x200); в – вакуолізація, дезорганізація епітелію (x250); г - гіалінові циліндри у просвіті каналців (250). Гематоксилін-еозин

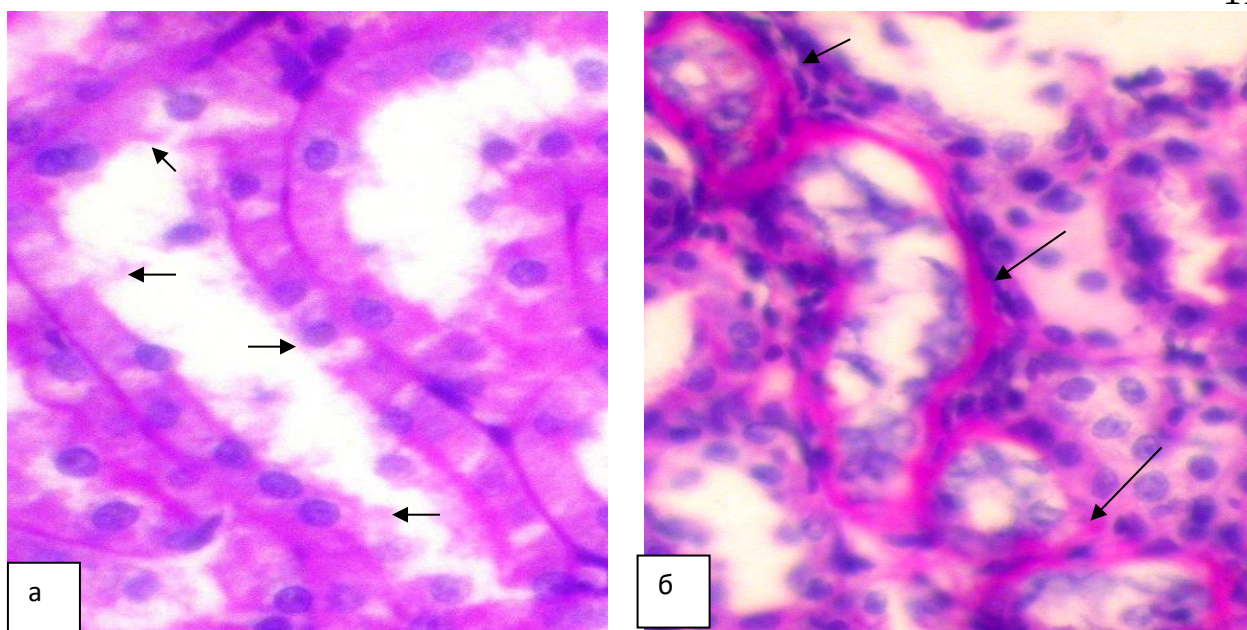


Рис. 4.16 Нирка щура після введення хромату калію: а – фрагментація щіткової облямівки; б - БМ частини каналців відсутня, в деяких - потовщена, розпушена. ШК-реакція за Мак-Манус, x400

Відмічена вогнищева не різко виразна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація інтерстиція кіркої речовини. У медулі простежено помірний тубулогідроз прямих каналців, вогнищева атрофія нефротелію.

Напівкількісна оцінка патологічних змін ниркових тілець і кіркових каналців нефрону щурів в умовах хромат-індукованої ниркової недостатності подана у табл. 4.7.

Після лікування ЕЗЗ у щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю констатували більше збереження цитоархітектоніки ниркової тканини. У більшій частині ниркових тілець виразно зменшено розмір сечового простору. У судинних клубочках, як правило, рисунок капілярної сітки чіткий, потовщення БМ капілярів не помічено.

Насиченість мезангіальних і ендотеліальних клітин у більшості клубочків наближена до інтактного контролю. Експансії мезангіуму, накопичення ШК-позитивного матеріалу в ньому або не відмічено, або виразність цих показників поступалася КП.

Морфометричні показники стану гломерулярних та тубулярних структур нирок щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю і при корекції її екстрактом зимолюбки зонтичної, бали

Морфологічні показники	Група експерименту			
	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Екстракт зимолюбки зонтичної	Розчин леспефрилу
Ниркові тільця: гідроектазія капсули, розширення мезангіуму, проліферація мезангіально-ендотеліальних клітин	0	7,8	4,3	3,6
Кіркові каналці: тубулогідроз, атрофія, дезорганізація, вакуолізація клітин	0	14	9,6	12,0

У частини клубочків зберігався розподіл на окремі частини («лапчатість»), в одиничних клубочках спостерігали спадіння капілярної сітки (рис. 4.17). В цілому виразність змін гломерулярного апарату у щурів після введення ЕЗЗ зменшилася на 44,87 % порівняно з щурами з нирковою недостатністю, не лікованих екстрактом (табл. 4.7).

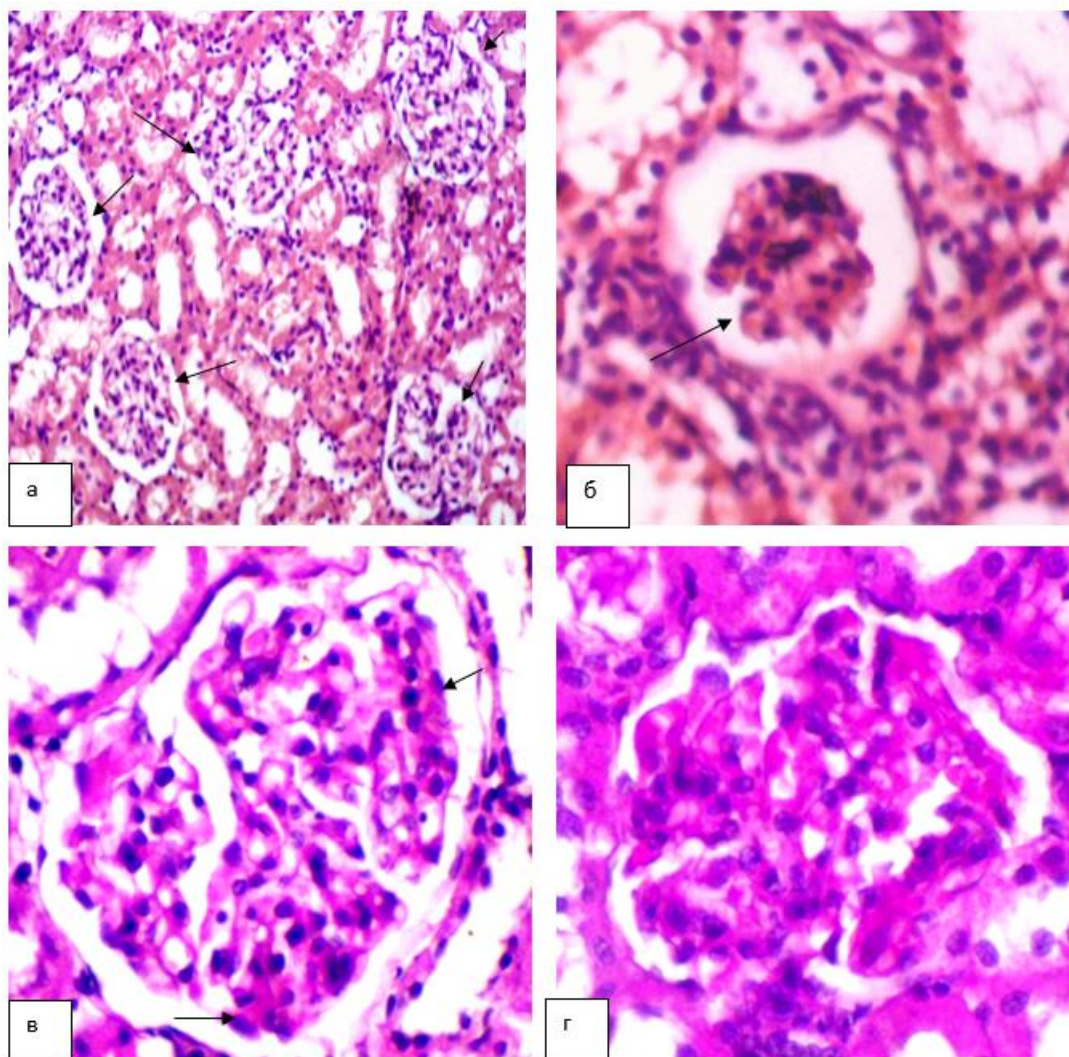


Рис. 4.17 Нирка щура з хромат-індукованою нирковою недостатністю після лікування екстрактом зимоліюбки зонтичної: а – зменшення гідроектазії капсули Шумлянського-Боумена у більшості ниркових тілець (стрілки), чіткий рисунок капілярної сітки, помірна насиченість капілярної сітки мезангіальними і ендотеліальними клітинами (x200); б – гідроектазія капсули, спадіння капілярної сітки у поодинокому судинному клубочку (x250); різна виразність розширення мезангіуму (в – дрібноосередкована, г – дифузна, x400). а-б – гематоксилін-еозин, в-г – ШК-реакція за Мак-Манус

У основній масі кіркових каналців ознаки тубулогідрозу відсутні. На невеликих ділянках кортико-медулярної зони частина каналців була розширена, але атрофії епітелію не спостерігали. В основному виявлено ознаки доволі

помірного набряку епітелію, вакуолізацію клітин без дезорганізації рисунку. Де-не-де видні гіалінови циліндри у просвіті каналців. Базальна мембрана каналців не пошкоджена, щиточкова облямівка епітелію дещо стоншена (рис. 4.18). За напівкількісною оцінкою ступень пошкодження кіркових каналців зменшено на 31,4 % порівняно з нелікованими щурами (табл. 4.7).

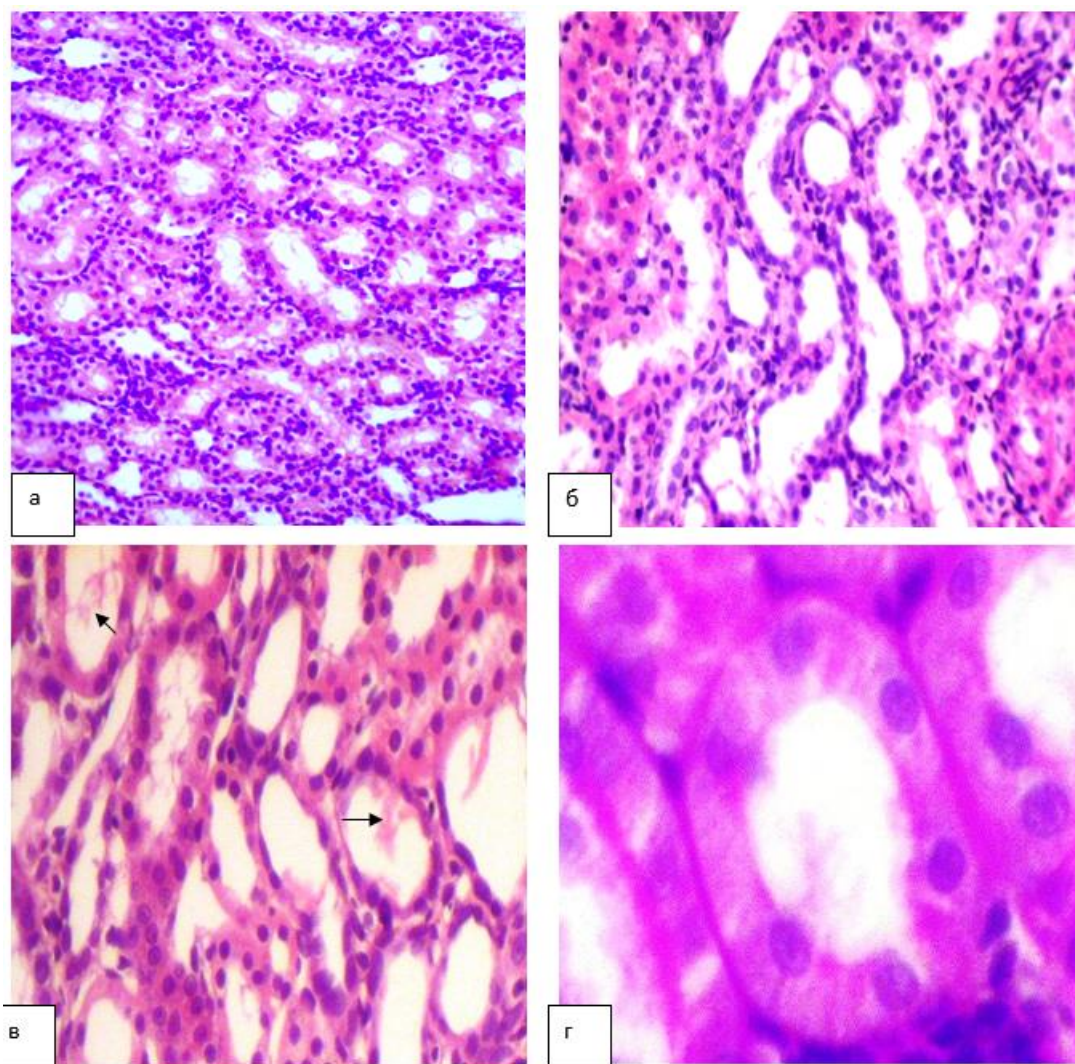


Рис. 4.18 Нирка щура з хромат-індукованою нирковою недостатністю після лікування екстрактом зимолоубки зонтичної: а – основна маса кіркових каналців без ознак тубулогідрозу, вакуолізація епітелію без пошкодження рисунку тканини (x200); б - набухання епітелію, тубулогідроз частини каналців кортико-медулярної зони (x250); в – гіалінови циліндри у просвіті деяких каналців (стрілки, x400); г – стоншення щіточкової облямівки, БМ каналців збережена (імерсія). а-в – гематоксилін-еозин, г – ШПК-реакція за Мак-Манус

Лікування щурів зі змодельованою нирковою недостатністю референс-препаратом розчином леспефріл виразно покращило стан ниркових тілець. Ознак ектазії капсули Шумлянського-Боумена майже не спостерігали, рисунок капілярної сітки чіткий, проліферації мезангіально-ендотеліальних клітин не виявлено. Спадіння капілярної сітки не візуалізували. Розширення мезангіуму було у межах помірного. БМ капілярів не потовщена (рис. 4.19). Виразність змін ниркових тілець у щурів після введення розчину леспефріл зменшилася на 53,85% відносно КП (табл. 4.7).

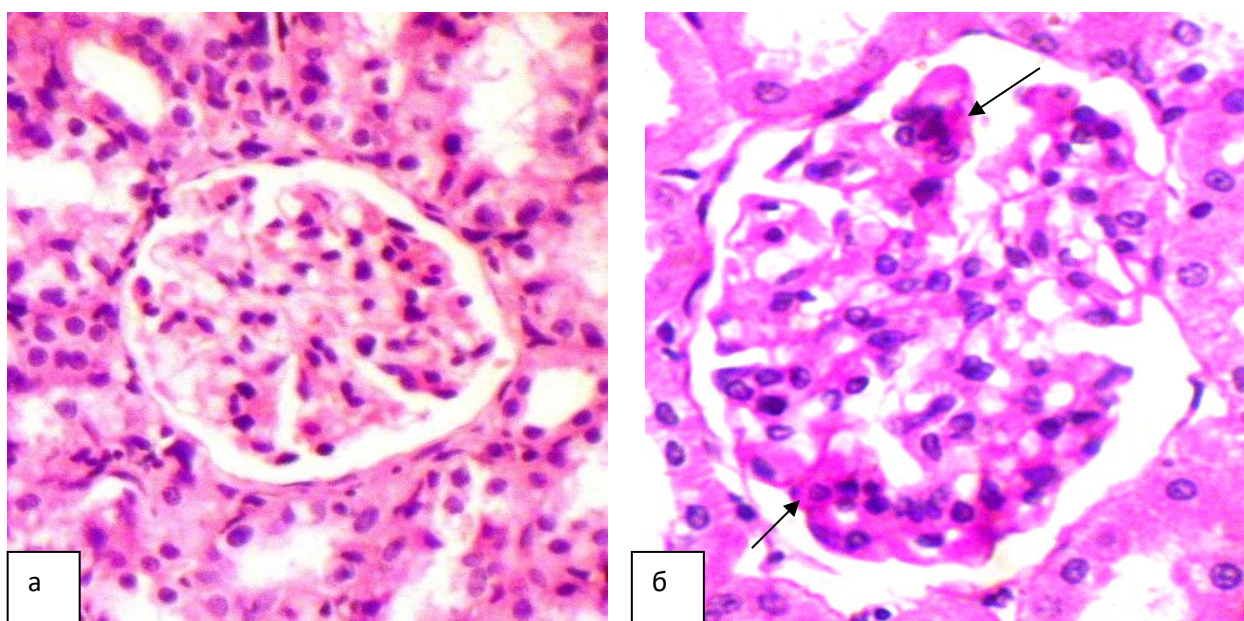


Рис. 4.19 Нирка щура з хромат-індукованою нирковою недостатністю після лікування розчином леспефріл: а – ниркове тільце без ознак ектазії капсули, інтракапілярної проліферації (x250); б – розширення мезангіуму у межах помірного (x400). а – гематоксилін-еозин, б – ШПК-реакція за Мак-Манус

Вплив на стан кіркових каналців після лікувального введення розчину леспефрілу було не таким показовим, як на ниркові тільця. І в кірковій речовині, і у кортико-медулярній зоні значна кількість каналців була з ознакою тубулогідрозу різного ступеню виразності. Епітелій сплющено, ділянками вакуолізовано, набряклий. В просвіті частини каналців видні гіалінови циліндри. Виявлені мікроділянки руйнування каналців (рис. 4.20). Все це

позначилося на бальній оцінці стану каналців, яка лише на 14,3% поступалася КП (табл. 4.7).

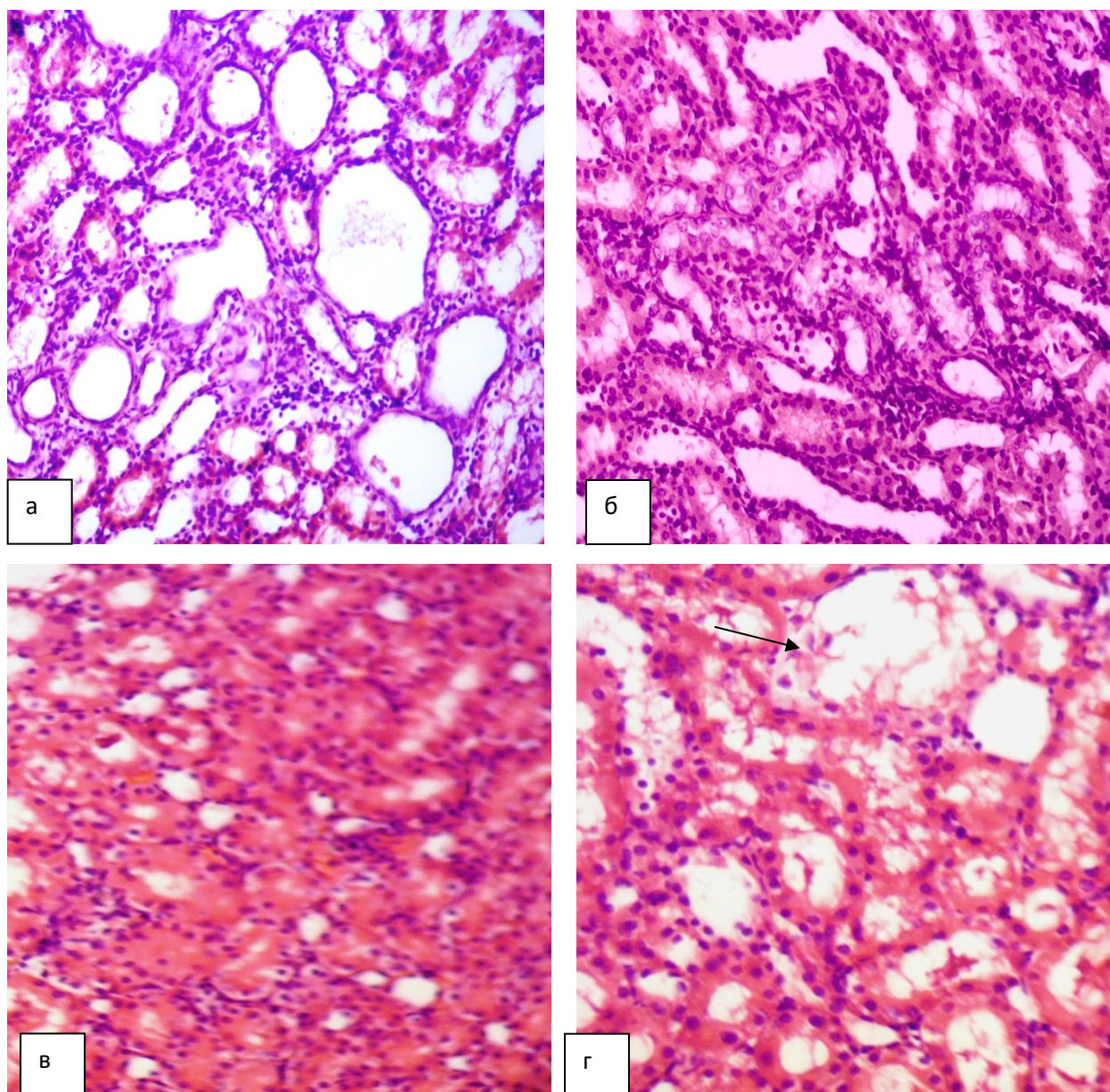


Рис. 4.20 Нирка щура з хромат-індукованою нирковою недостатністю після лікування розчином леспефріл: різна виразність тубулогідрозу (а – кіркові каналці, б – кортико-медулярні каналці, x200), набряклість епітелію (в, x250), гіалінові циліндри у просвіті каналців, мікроділянка (стрілка)руйнації каналців (г, x250). Гематоксилін-еозин

Відповідно, щітчаста облямівка каналців часто пошкоджена, БМ частини потовщена (рис. 4.21).

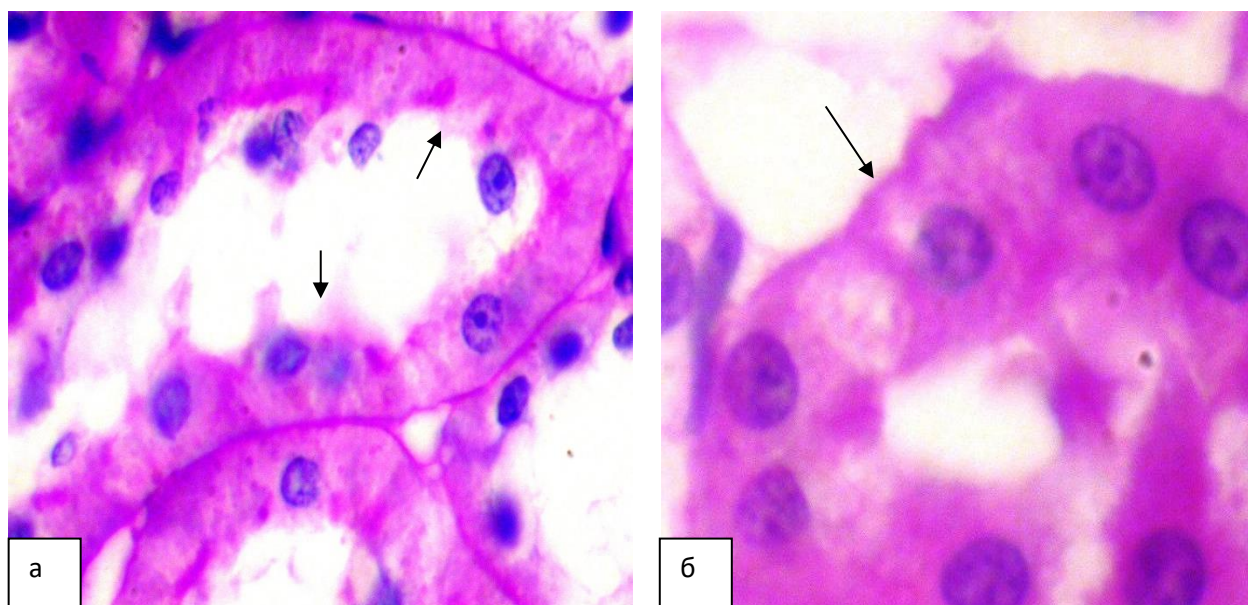


Рис. 4.21 Нирка щура з хромат-індукованою нирковою недостатністю після лікування розчином леспефріл: а - розпушеність, пошкодження щітчастої облямівки каналця; б – фрагментарне потовщення БМ. ШК реакція за Мак Манус, імерсія

Після лікування екстрактом у щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю констатували більше збереження цитоархітектоніки ниркової тканини. У більшій частині ниркових тілець виразно зменшено розмір сечового простору. У судинних клубочках, як правило, рисунок капілярної сітки чіткий, потовщення БМ капілярів не помічено. Насиченість мезангіальних і ендотеліальних клітин у більшості клубочків наближена до інтактного контролю.

4.4.4 Дослідження протизапальної активності екстракту трави зимолубки зонтичної

Основним загальноприйнятим етапом вивчення протизапальних властивостей лікарських засобів та потенційних тест-зразків є дослідження антиексудативної дії на моделі асептичного ексудативного запалення. З цією метою в ході експерименту було застосовано модель карагенінового набряку стопи у лабораторних щурів [14].

Отримані результати свідчать, що протягом трьох годин після відтворення запальної реакції в контрольній групі відбувалось посилення ексудативних процесів у кінцівках тварин. Так, у порівнянні з початковими значеннями об'єм набряку на першу годину дослідження стопи склав $0,65 \text{ см}^3$, на другу годину – $0,86 \text{ см}^3$, і на третю годину – $1,05 \text{ см}^3$ (табл. 4.8).

Через 1 годину після введення флогогену жодний з тест-зразків в жодній досліджуваній дозі не сприяв вірогідному зменшенню набряку (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Об'єм набряку стопи щурів за умов субплантарного введення карагеніну на тлі застосування тест-зразків, n=6, (M±SEM)

Дослідна група	Показник	Вихідні значення	Через 1 год.	Через 2 год.	Через 3 год.
НК	V стопи, см^3	$1,325 \pm 0,054$	$1,973 \pm 0,041$	$2,185 \pm 0,048$	$2,377 \pm 0,045$
	V набряку, см^3	-	$0,648 \pm 0,017$	$0,860 \pm 0,023$	$1,052 \pm 0,017$
BE (0,5 мл/кг)	V стопи, см^3	$1,368 \pm 0,075$	$1,997 \pm 0,066$	$2,148 \pm 0,067$	$2,350 \pm 0,067$
	V набряку, см^3	-	$0,628 \pm 0,025$	$0,780 \pm 0,019$	$0,982 \pm 0,014$ a
CE5 (0,5 мл/кг)	V стопи, см^3	$1,353 \pm 0,033$	$2,000 \pm 0,047$	$2,103 \pm 0,019$	$2,255 \pm 0,020$
	V набряку, см^3	-	$0,647 \pm 0,017$	$0,750 \pm 0,017$ a	$0,902 \pm 0,021$ a
CE7 (0,5 мл/кг)	V стопи, см^3	$1,333 \pm 0,051$	$1,943 \pm 0,063$	$2,072 \pm 0,059$	$2,215 \pm 0,055$
	V набряку, см^3	-	$0,610 \pm 0,020$	$0,738 \pm 0,012$ a	$0,882 \pm 0,015$ a

Дослідна група	Показник	Вихідні значення	Через 1 год.	Через 2 год.	Через 3 год.
BE (0,75 мл/кг)	V стопи, см ³	1,343±0,052	1,965±0,062	2,085±0,065	2,263±0,062
	V набряку, см ³	-	0,622±0,020	0,742±0,023 _a	0,920±0,030 _a
CE5 (0,75 мл/кг)	V стопи, см ³	1,345±0,046	1,968±0,044	2,048±0,043	2,232±0,042
	V набряку, см ³	-	0,623±0,016	0,703±0,017 _a	0,887±0,026 _a
CE7 (0,75 мл/кг)	V стопи, см ³	1,325±0,029	1,940±0,029	2,018±0,028	2,182±0,023
	V набряку, см ³	-	0,615±0,012	0,693±0,015 _a	0,857±0,019 _a
BE (1 мл/кг)	V стопи, см ³	1,348±0,052	1,968±0,067	2,062±0,066	2,232±0,064
	V набряку, см ³	-	0,620±0,024	0,713±0,021 _a	0,883±0,025 _a
CE5 (1 мл/кг)	V стопи, см ³	1,330±0,068	1,945±0,078	2,032±0,072	2,180±0,066
	V набряку, см ³	-	0,615±0,031	0,702±0,019 _a	0,850±0,022 _a
CE7 (1 мл/кг)	V стопи, см ³	1,345±0,059	1,967±0,058	2,050±0,059	2,173±0,063
	V набряку, см ³	-	0,612±0,021	0,695±0,023 _a	0,818±0,025 _a

Примітка. а – відмінності вірогідні відносно негативного контролю ($p < 0,05$).

На другу годину спостереження, помірно статистично значуще зменшення набряку спостерігалася в усіх досліджуваних групах, окрім BE (0,5 мл/кг). Дози тест-зразка BE, що продемонстрували активність були здатні зменшувати набряк на 13,7% (в дозі 0,75 мл/кг) та на 17,1% (в дозі 1 мл/кг) у порівнянні з аналогічною контрольною точкою в групі НК ($p < 0,05$). Тест-зразок CE5 на 2 годину спостереження сприяв вірогідному зменшенню набряку на 12,8%, 18,3% та 18,4% (в дозах 0,5мл/кг, 0,75мл/кг та 1 мл/кг відповідно) у порівнянні з негативним контролем. Під впливом тест-зразка CE7 набряк вірогідно зменшувався на 14,2% (0,5мл/кг), 19,4% (0,75мл/кг) та 19,2% (1 мл/кг) в трьох досліджуваних рівнях доз ($p < 0,05$ проти НК). Разом з цим, тест-зразок CE7 продемонстрував найбільший відносний ефект на 2 годину (табл. 4.6).

На третю годину спостереження помірно вірогідне зменшення набряку викликали всі тест-зразки в усіх досліджуваних дозах. На тлі застосування зразка BE в дозах 0,5мл/кг, 0,75мл/кг та 1 мл/кг об'єм набряку зменшувався на 6,7%,

12,5% та 16,06%, відповідно, у порівнянні з НК. Тест-зразок СЕ5 на 3 годину спостереження сприяв вірогідному зменшенню набряку на 14,3%, 15,7% та 19,2% (в дозах 0,5мл/кг, 0,75мл/кг та 1 мл/кг відповідно) у порівнянні з негативним контролем. Найбільший відносний протизапальний ефект на 3 години помічали на тлі застосування тест-зразка СЕ7, під дією якого набряк вірогідно зменшувався на 16,2%, 18,5% та 22,2% у порівнянні з аналогічною контрольною точкою в групі НК (табл. 4.6).

Усі досліджувані зразки продемонстрували статистично значущий ефект на 3 годину дослідження. Експериментально значущим, для фармакологічного вивчення протизапальних засобів значущим є рівень фармакологічної активності не менш 20 %. Тому, ґрунтуючись на отриманих експериментальних даних, для подальших поглиблених досліджень за показником протизапальної активності можуть бути рекомендовані тест-зразки СЕ7 та СЕ5 у дозі 1 мл/кг, що продемонстрували усереднену протизапальну активність на відповідному рівні.

Також варто відзначити, що хоча й між дозами не спостерігалось значущих відмінностей, проте на 3 годину спостереження відмічався ймовірний дозозалежний ефект у всіх досліджуваних об'єктів. Таким чином, з високою ймовірністю можна посилити ефект шляхом концентрації діючої речовини за рахунок ліофілізації рідких екстрактів [44].

4.4.5 Дослідження антимікробної дії екстракту трави зимолоубки зонтичної

Дослідження антимікробної дії проводили на базі ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова" під керівництвом завідувачки лабораторії біохімії та біотехнології к.біол.н., ст.н.с. Осолодченко Т.П. Методика проведення експерименту наведена у розділі 2.

За результатами дослідження [91] було встановлено, що екстракт трави зимолоубки зонтичної проявляє антибактеріальні властивості до тестових мікроорганізмів, де діаметри зон затримки росту були на рівні 20-28 мм (табл. 4.9).

**Антибактеріальна дія зразка до тестових мікроорганізмів методом дифузії
в агар**

Зразок	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Екстракт зимолубки зонтичної	27, 27, 28	24, 25, 25	23, 24, 25	23, 24, 24	27, 28, 28	20, 21, 22

Результати досліджень показали, що зразок володіє антибактеріальними властивостями по відношенню до всіх клінічних штамів мікроорганізмів, де зони затримки росту були в межах 19-24 мм (табл. 4.10).

Таблиця 4.10

**Антибактеріальна дія зразка до клінічних мікроорганізмів методом дифузії
в агар**

Зразок	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i> 124	<i>Enterococcus faecalis</i> 42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 64	<i>Candida albicans</i> 69
Екстракт зимолубки зонтичної	23, 24, 24	22, 22, 23	20, 21, 21	22, 23, 22	20, 20, 19

Дані табл. 4.11 показують, що зразок (розведений стерильною дистильованою водою) в розведенні проявляє антибактеріальні властивості до

всіх тестових мікроорганізмів. Високі показники залишаються при розведенні 1:4 (20-28 мм до 18-24 мм), далі зони затримки поступово зменшуються 14-15 мм.

При розведенні 1:32 протимікробна дія спостерігається у *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Таблиця 4.11

**Антибактеріальна дія зразка до тестових мікроорганізмів в розведенні
методом дифузії в агар**

Зразок екстракт зимоліюбки зонтичної розведення	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
Без розведення	27, 27, 28	24, 25, 25	23, 24, 25	23, 24, 24	27, 28, 28	20, 21, 22
1:2	27, 26, 26	23, 23, 23	21, 22, 22	21, 22, 21	24, 25, 25	18, 19, 19
1:4	24, 23, 23	21, 21, 22	20, 19, 18	20, 18, 19	23, 23, 22	17, 16, 16
1:8	21, 21, 20	19, 19, 20	17, 17, 17	17, 17, 17	20, 20, 19	15, 14, 14
1:16	19, 18, 19	17, 16, 16	14, 15, 15	14, 14, 14	17, 16, 16	13, 13, 12
1:32	15, 16, 16	14, 14, 14	ріст	ріст	14, 15, 15	ріст

У табл. 4.12 дані результати досліджень показують, що зразок (розведений стерильною дистильованою водою) в розведенні 1:4 проявляє антибактеріальні властивості до всіх клінічних штамів мікроорганізмів. Розведення 1:8 та 1:16 проявляють слабку антибактеріальну дію (діаметри зон затримки росту 12-15 мм). При розведенні 1:32 протимікробна дія не спостерігається.

**Антибактеріальна дія зразка до клінічних мікроорганізмів в розведенні
методом дифузії в агар**

Зразок екстракт зимолюбки зонтичної розведення	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм				
	<i>Staphylococcus aureus</i> 124	<i>Enterococcus faecalis</i> 42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 64	<i>Candida albicans</i> 69
без розведення	23, 24, 24	22, 22, 23	20, 21, 21	22, 23, 22	20, 20, 19
1:2	21, 20, 20	19, 20, 20	19, 18, 19	20, 20, 19	18, 17, 18
1:4	17, 18, 18	17, 16, 17	17, 16, 17	18, 17, 17	16, 15, 16
1:8	15, 14, 14	14, 15, 15	15, 14, 15	15, 16, 16	13, 14, 14
1:16	13, 13, 14	13, 12, 12	13, 13, 12	13, 13, 13	12, 12, 12
1:32	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст

Проведено дослідження по визначенню антибактеріальної активності зразка протягом 28 діб (табл. 4.13 та 4.14).

Дані табл. 4.13 та табл. 4.14 свідчать, що антибактеріальні властивості досліджуваного зразка – екстракту зимолюбки зонтичної по відношенню до тестових та клінічних штамів мікроорганізмів не змінюється протягом 28 діб.

Експериментально встановлено, що досліджуваний зразок зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий проявляє антибактеріальну активність по відношенню до музейних штамів: грампозитивні мікроорганізми *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, спорову культуру *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамнегативні *Proteus vulgaris* ATCC 4636 та *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653 та клінічних штамів: *Staphylococcus aureus* 124, *Enterococcus faecalis* 42, *Pseudomonas aeruginosa* 18, *Klebsiella pneumoniae* 64, *Candida albicans* 69.

Таблиця 4.13

Антибактеріальна дія зразка протягом 28 діб до тестових мікроорганізмів

Зразок екстракт зимоліюбки зонтичної	Кількість діб	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653
	первинний	27, 27, 28	24, 25, 25	23, 24, 25	23, 24, 24	27, 28, 28	20, 21, 22
	2 доби	27, 27, 27	25, 25, 25	24, 24, 24	24, 24, 24	28, 28, 28	20, 21, 21
	7 діб	27, 28, 28	24, 24, 25	23, 24, 24	24, 24, 23	27, 28, 28	22, 21, 21
	14 діб	27, 27, 27	25, 24, 25	23, 23, 24	23, 23, 23	27, 27, 28	21, 21, 21
	28 діб	27, 27, 28	25, 24, 24	23, 23, 24	24, 23, 23	27, 27, 27	20, 21, 20

Таблиця 4.14

Антибактеріальна дія зразка протягом 28 діб до клінічних мікроорганізмів

	Кількість діб	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм				
		<i>Staphylococcus aureus</i> 124	<i>Enterococcus faecalis</i> 42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 18	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 64	<i>Candida albicans</i> 69
Зразок екстракт зимоліюбки зонтичної	Первинний	23, 24, 24	22, 22, 23	20, 21, 21	22, 23, 22	20, 20, 19
	2 доби	24, 24, 24	22, 22, 23	21, 21, 21	22, 22, 23	20, 20, 20
	7 діб	24, 24, 24	23, 23, 22	21, 21, 21	23, 23, 22	19, 20, 20
	14 діб	23, 23, 24	23, 22, 22	20, 21, 20	22, 22, 22	19, 19, 20
	28 діб	24, 23, 23	21, 22, 23	20, 20, 21	22, 22, 21	20, 20, 19

В розведенні проявляє екстракт зимолоубки має антибактеріальні властивості до всіх тестових мікроорганізмів. Високі показники залишаються при розведенні 1:4 (20-28 мм до 18-24 мм), далі зони затримки поступово зменшуються 14-15 мм. При розведенні 1:32 протимікробна дія спостерігається у *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Результати досліджень для клінічних штамів показують, що зразок в розведенні 1:4 проявляє антибактеріальні властивості до всіх клінічних штамів мікроорганізмів. Розведення 1:8 та 1:16 проявляють слабку антибактеріальну дію (діаметри зон затримки росту 12-15 мм). При розведенні 1:32 протимікробна дія не спостерігалась.

4.5 Розробка твердої лікарської форми з екстрактом зимолоубки зонтичної трави рідким

При розробці лікарського засобу для внутрішнього застосування актуальним постає питання визначення форми препарату [98]. Таблетки з імуномодулюючою, антиоксидантною та протизапальною активністю, якими володіє зимолоубки зонтичної трави екстракт рідкий є більш доречною формою, ніж капсули, з декількох причин. Таблетки забезпечують високу точність дозування, що важливо для ефективності лікування. Крім того, таблетки, за рахунок оптимально підібраного складу допоміжних речовин, можна розробити з модифікованим вивільненням, що дозволяє підтримувати стабільну концентрацію активної речовини в організмі та продовжити її дію. Ще однією перевагою є їхня краща стабільність під час зберігання, адже таблетки менш чутливі до вологості та температурних змін, ніж капсули. З урахуванням використання в якості АФІ рідкого екстракта – питання стабільності засобу є особливо важливим [35, 104].

Окрім цього, таблетки зазвичай менші за розміром, що полегшує їх прийом, а також їхнє виробництво є економічно вигіднішим. Усе це робить

таблетовану форму більш зручною та ефективною для лікування імуномодуючими, антиоксидантними та протизапальними препаратами.

4.5.1 Підходи до використання технології liquisolid (LSS)

При розробці лікарського засобу надзвичайно важливо правильно підібрати технологію виготовлення та якісний і кількісний склад – від цього залежить якість, ефективність і стабільність препарату [13]. Оптимальна технологія забезпечує рівномірний розподіл діючої речовини, механічну міцність таблеток, їх здатність швидко або пролонговано вивільняти активний компонент у організмі [39].

Техніка liquisolid є інноваційним підходом у фармацевтичній розробці, спрямованим, наприклад, на підвищення розчинності та швидкості розчинення лікарських засобів з низькою водорозчинністю. Цей метод передбачає перетворення рідких препаратів, таких як розчини або суспензії лікарських засобів у нелетких розчинниках, у сухі, сипучі та придатні для пресування порошки. Процес досягається шляхом змішування рідкого препарату з вибраними носіями та покривними матеріалами, що призводить до створення liquisolid системи [52; 74].

Основною перевагою цього методу є суттєве покращення біодоступності гідрофобних препаратів, оскільки він підвищує їх змочуваність і збільшує площу поверхні, доступну для розчинення [93]. Крім того, liquisolid-система може використовуватися для пролонгованого або контрольованого вивільнення лікарських засобів, що робить її універсальним інструментом у розробці різних пероральних лікарських форм [94]. Останні дослідження також продемонстрували потенціал технології liquisolid у підвищенні стабільності та ефективності лікарських засобів із низькою водорозчинністю, що розширює її застосовність у фармацевтичній промисловості [120].

Техніка liquisolid є інноваційним методом і передбачає адсорбцію рідких екстрактів на пористі носії, такі як магнісвий алюмініометасилікат, з подальшим

пресуванням у таблетки [8, 9, 10]. Ця техніка успішно застосовувалась до різних рослинних екстрактів, зокрема *Aronia melanocarpa*, *Crataegus leavigata*, *Rosa canina* та *Curcuma comosa* [52, 109].

Liquisolid-таблетки демонструють покращені профілі розчинення та підвищену біодоступність активних сполук у порівнянні з нативними екстрактами [105]. Вибір розчинника (вода або етанол) та методу сушіння (мікрохвильове або гаряче повітря) можуть впливати на властивості таблеток і антиоксидантну активність [52]. Загалом, техніка liquisolid [85] дозволяє отримати таблетки з відмінними фізичними характеристиками, включаючи короткий час розпадання та розчинення, що робить її перспективним підходом для переробки широкого спектра рідких рослинних екстрактів у тверді лікарські форми [75, 94].

При проведенні фармацевтичної розробки таблеток, із використанням зимолоубки зонтичної трави екстракта рідкого, який отримували 50 %-вим етанолом за технологією [16]. Проведені фармакологічні дослідження показали, що терапевтичною дозою даного екстракта є 0,72 мл/кг (добова доза на людину). Кількість активних діючих речовин екстракту (фенольних сполук) була стандартизована [121].

В якості допоміжних речовин використовувались ексципієнти, що входять до переліку допоміжних речовин, дозволених до застосування у складі ліків і затверджених Наказом МОЗ України № 339 від 19.06.2007 [26]. Оцінку параметрів якості розроблених таблеток та грануляту (визначення середньої ваги, вмісту сухих речовин, плинність, стиранність, органолептичні показники) визначали згідно відповідних методик Державної Фармакопеї України (ДФУ) [11].

Першочерговим етапом визначення технології отримання таблеток стало дослідження вмісту екстрактивних (сухого залишку) речовин в складі зимолоубки зонтичної трави екстракту рідкого. Етап визначення вмісту сухих речовин є ключовим у стандартизації екстракту зимолоубки, оскільки він визначає кількість активних компонентів, які будуть використані у складі

таблеток.

Згідно проведеного дослідження та отриманих даних, вміст екстрактивних речовин у екстракті зимолубки становить $47,0 \pm 1,0\%$. Цей показник був використаний для подальших етапів розробки, включаючи визначення пропорцій компонентів у складі таблеток. Отримані результати дозволили стандартизувати екстракт для забезпечення повторюваності технологічного процесу.

Введення до складу таблеток рослинного екстракту обумовлює використання в процесі технології таблеток значної кількості допоміжних речовин або попереднього гранулювання. Наявність рідкої фази екстракту вимагає вивчення можливості застосування технології *liqui-solid* (рідко-твердої), що забезпечить рівномірний розподіл активних компонентів у твердій матриці та підвищенні біодоступності [74, 123].

Для проведення дослідження щодо використання технології *liquid-solid* (LSS), екстракт зимолубки з масовою часткою екстрактивних речовин 47,0%, розчиняли у водно-етаноловому розчині (співвідношення екстракт:розчинник як 1:1). Даний технологічний прийом забезпечував рівномірність розподілу активних компонентів у рідкій фазі.

В якості твердої фази використовували синтетичну аморфну форму алюмометасиліката магнію (Neusilin US2). До твердої матриці поступово додавали рідку фазу з розведеним екстрактом зимолубки, постійно перемішуючи до отримання однорідної суміші. До екстракту, який був абсорбований на часточках Neusilin US2, додавали наповнювач мікрокристалічну целюлозу (Avicel PH101), дезінтегрант натрія кроскармелоза (Vivasol) та антифрикційні речовини діоксид кремнію (Aerosil 200) і магнія стеарат. Співвідношення компонентів було підібрано згідно класичних вимог до виробництва твердих лікарських форм [39, 43].

Суміш безпосередньо після приготування піддавалася таблетуванню на однопуансоному таблетковому пресі. Середня маса отриманих таблеток становила 0,29 г та діаметр 10 мм. Для виготовлення таблеток було визначено

оптимальний склад (табл. 4.15). Експериментально було визначено, що отримані таблетки володіли фармако-технологічними властивостями, що були на межі дозованих ДФУ (табл. 4.16).

Таблиця 4.15

Склад таблеток (модельний зразок 1)

Компонент	Пропорція (%)
Зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий	12,5
Етанол (Вода)	12,5
Алюмометасилікат магнію Neusilin US2	25,0
Діоксид кремнію Aerosil 200	0,5
Мікрокристалічна целюлоза Avicel PH101	46,5
Магнія стеарат	1,0
Натрія кроскармелоза Vivasol	2,0
Загальна маса:	100,0

Таблиця 4.16

Дослідження фармако-технологічних показників модельного зразка 1

Показник	Результат дослідження	Вимоги ДФУ
Стійкість таблеток до роздавлювання	33 ± 2 Н	ДФУ 2.0, т.1, 2.9.8 <i>Не менше 30 Н</i>
Стираність таблеток без оболонки	$0,78 \pm 0,09$ %	ДФУ 2.0, т.1, 2.9.7 <i>Не більше 1,00%</i>
Розпадання таблеток	$9,3 \pm 0,3$ хв	ДФУ 2.0, т.1, 2.9.1 <i>Не більше 15,0 хв.</i>

Примітка. ($p \leq 0,05$), $n = 6$.

Попри успішне використання технології Liqui-Solid для створення таблеток з рідким екстрактом зимолубки зонтичної, під час проведення дослідження були виявлені значні недоліки, які впливають на якість готового продукту, та знижують як органолептичні, так і фармакотехнологічні властивості таблеток:

1. Neusilin US2, що використовувався як адсорбент для інтеграції рідкої фази, має високу пористість, тому займає значний об'єм у складі таблетки. Через це об'єм твердої матриці суттєво збільшується, що обмежує можливість включення інших компонентів, зокрема активного інгредієнта. Готова таблетка має незадовільні геометричні параметри (тонка) і невелику щільність, що може впливати на її механічну стійкість і зручність споживання.

2. Низьке дозування екстракту. Через значний об'єм, зайнятий допоміжними речовинами, вміст активного інгредієнта (екстракту зимолубки) у таблетці залишається низьким. У сформованій таблетці масою 0,29 г частка екстракту становить лише 12,5% (~ 0,036 г). Таке низьке дозування потребує збільшення кількості таблеток, необхідних для досягнення терапевтичного ефекту. Це не лише знижує зручність застосування для пацієнта, але й може призводити до підвищення витрат на лікування через більший обсяг прийому препарату.

3. Через використання об'ємного Neusilin US2 таблетка набуває нерівномірної поверхні, що може негативно вплинути на сприйняття продукту споживачем. Тонкі таблетки важче таблетувати, оскільки існує ризик розшарування або утворення мікротріщин при механічному навантаженні.

4. Значна кількість адсорбенту може ускладнити контроль за відтворюваністю складу таблеток між партіями. Високий об'єм допоміжних речовин збільшує ризик деградації активного інгредієнта через можливий контакт із залишковою вологістю або адсорбованим розчинником.

В зв'язку із вищенаведеними факторами необхідно вдосконалити технологію отримання таблеток.

4.5.2 Використання мікрокристалічної целюлози в технології *liquisolid* при розробці таблеток із рідким екстрактом зимолоубки

Для мінімізації впливу виявлених недоліків доцільно реалізувати комбінований підхід, який об'єднує три взаємопов'язані стратегії:

– *Заміна Neusilin US2 на мікрокристалічну целюлозу (марки МКЦ 101)*. МКЦ 101 має значно меншу об'ємність, порівняно з Neusilin US2, що дозволяє зменшити загальний об'єм таблетки та збільшити частку активного інгредієнта в складі. Використання МКЦ 101 також покращує механічну міцність таблеток завдяки її властивостям зв'язуючого агента.

– *Оптимізація співвідношення компонентів*. Використання МКЦ 101 як основного адсорбенту в поєднанні з мінімально необхідними кількостями допоміжних речовин, таких як аеросил і магнію стеарат, дозволить зберегти технологічну придатність суміші та збільшити дозування екстракту зимолоубки.

– *Модифікація технології*. Перехід до оптимізованої технології, що базується на використанні МКЦ 101, може дозволити не лише зменшити об'єм допоміжних речовин, але й забезпечити рівномірний розподіл екстракту в матриці таблетки, покращуючи її стабільність і фармакологічну ефективність.

Попри переваги технології Liquid-Solid (LSS), такі як рівномірний розподіл рідкої фази та відсутність етапу сушіння, недоліки у вигляді низького дозування екстракту та великого об'єму допоміжних речовин суттєво обмежують її застосування. Тому подальші дослідження були спрямовані на оптимізацію складу таблетки та вдосконалення технологічного процесу.

Подальшим етапом роботи стало визначення здатності мікрокристалічної целюлози 101 (МКЦ 101) абсорбувати екстракт зимолоубки та виконувати функцію наповнювача для забезпечення стабільності та технологічної придатності суміші.

Для експерименту використовували зимолоубки зонтичної трави екстракт рідкий із вмістом екстрактивних речовин 47,0% та МКЦ 101 як адсорбент і наповнювач.

Для партії (модельних сумішей зразок №1 МКЦ 101) співвідношення МКЦ 101:екстракт становило як 4:5,2. Для партії (модельних сумішей №2 МКЦ 101) співвідношення МКЦ 101:екстракт становило як 2,5:5.

Екстракт зимолоубки зонтичної змішували з зразок №1 МКЦ 101101 у зазначених пропорціях. Поступове додавання зразок №1 МКЦ 101101 до екстракту забезпечувало рівномірну адсорбцію рідкої фази. Після змішування оцінювали консистенцію отриманої суміші, візуально перевіряли, чи утворюються грудки. Результати органолептичного дослідження отриманих модельних зразків представлені в табл. 4.17.

Таблиця 4.17

Результати органолептичного аналізу використання МКЦ 101

Параметр	зразок №1 МКЦ 101	зразок №2 МКЦ 101
Співвідношення МКЦ 101:екстракт	4:5,2	2,5:5
Консистенція суміші	Не сипуча, порошкова, не злипалася	В'язка, злипається в єдиний комок

При співвідношенні 4:5,2 МКЦ 101 забезпечує формування порошкової суміші, яка не є сипкою, але має достатню стабільність для подальшого використання. При співвідношенні 2,5:5 суміш забезпечує вищу концентрацію активного екстракту, але є більш в'язкою, що ускладнює її однорідність та подальше використання у технології таблеток.

Різна консистенція отриманих сумішей демонструє значний вплив співвідношення МКЦ 101:екстракт на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту. Мікрокристалічна целюлоза ефективно виконує функцію адсорбента та наповнювача, однак консистенція сумішей значно залежить від співвідношення МКЦ 101:екстракт. Для партій із високим вмістом МКЦ 101 отримували стабільні порошкові суміші, тоді як із меншим вмістом МКЦ 101 суміші мали в'язку консистенцію. Оптимальне співвідношення компонентів

потребує подальших досліджень для досягнення необхідної технологічної придатності.

З метою визначення можливості використання грануляту, отриманого шляхом змішування МКЦ 101 із екстрактом зимолубки, для формування таблеток із заданими технологічними характеристиками було проведено таблетування гранул із вмістом МКЦ 101 та рідкого екстракта зимолубки.

МКЦ 101 була поєднана в лабораторному змішувачі із екстрактом зимолубки у співвідношенні 4:5,2 (МКЦ 101:екстракт зимолубки). Суміш сушили до отримання сипучого грануляту. До грануляту додавали дезінтегрант Vivasol у кількості 2,0% від розрахованої маси таблеткової маси, калібрували через сито 2 мм та опудрювали магнію стеаратом (1,0%). Отриману суміш таблетували на однопуансонному таблетковому пресі, матриця діаметром 10 мм. Середня маса таблетки склала 0,436 г, а згідно розрахунків щодо вмісту екстрактивних речовин (екстракту зимолубки) – 158 мг на одну таблетку (табл. 4.18).

Таблиця 4.18

Склад модельних таблеток із вмістом МКЦ 101

Компонент	Співвідношення (%)	Маса на 1 таблетку (г)
Мікрокристалічна целюлоза 101 (МКЦ 101)	60,625	0,265
Екстракт рідкий зимолубки (у перерахунку на екстрактивні речовини)	36,375	0,158
Vivasol	2,000	0,009
Магнію стеарат	1,000	0,004
Разом	100,000	0,436

Отримані результати показали, що використання грануляту МКЦ 101 із рідким екстрактом зимолубки дозволяє отримати таблетки із рівномірним

розподілом компонентів та задовільними фізико-хімічними характеристиками. Однак вміст активної речовини (158 мг екстрактивних речовин на одну таблетку) є недостатнім для досягнення терапевтичної ефективності. Це свідчить про необхідність подальшої оптимізації складу та технологічного процесу.

4.5.3 Застосування подвійного гранулювання при розробці таблеток

Перспективним напрямком для подальших досліджень є впровадження технології подвійного гранулювання, яка передбачає:

- початкове формування грануляту МКЦ 101 із рідким екстрактом зимоліюбки;
- повторне гранулювання з додатковим внесенням екстракту у вже сформований гранулят.

Такий підхід дозволить збільшити кількість активного інгредієнта у складі грануляту без зміни об'єму МКЦ 101, що дасть змогу досягти більшого вмісту екстракту в готових таблетках. Використання технології подвійного гранулювання також може забезпечити рівномірний розподіл активного інгредієнта та зберегти необхідну текучість суміші для подальшого таблетування. Таким чином, дослідження подвійного гранулювання відкриває перспективи для створення таблеток, що відповідають як технологічним, так і фармакологічним вимогам.

Для проведення досліджень щодо можливості використання подвійного гранулювання нами було підготовлені наступні модельні зразки (табл. 4.19).

Згідно наведеним складам в табл. 4.19, при використанні подвійного гранулювання, було застосовано наступну технологію (сушку гранул проводили до залишкової вологи 4,0 % після кожного з етапів гранулювання):

**Склад модельних зразків таблеток, виготовлених за технологією
подвійного гранулювання (модельні зразки F1-F4)**

№ п/п	Компоненти	Співвідношення, %	Підходи до гранулювання
Модельний зразок F1			
1	МКЦ 101	56,30	1. МКЦ 101: екстракт 4:4 2. МКЦ 101: екстракт 4:2
2	Екстракт зимолубки у перерахунку на сухий залишок	39,70	
3	Vivasol	3,00	
4	Магнію стеарат	1,00	
Модельний зразок F2			
1	МКЦ 101	65,31	1. МКЦ 101 : суміш екстракт - вода очищена (2:1) 4:4 2. МКЦ 101 : суміш екстракт - вода очищена (2:1) 4:2
2	Екстракт зимолубки у перерахунку на сухий залишок	30,69	
3	Vivasol	3,00	
4	Магнію стеарат	1,00	
№ п/п	Компоненти	Співвідношення, %	Підходи до гранулювання
Модельний зразок F3			
1	МКЦ 101	65,31	1. МКЦ 101 : суміш екстракт — вода очищена (2:1) 4:3 2. МКЦ 101 : суміш екстракт — вода очищена (2:1) 4:3
2	Екстракт зимолубки у перерахунку на сухий залишок	30,69	
3	Vivasol	3,00	
4	Магнію стеарат	1,00	
Модельний зразок F4			
1	МКЦ 101	65,31	1. МКЦ: суміш екстракт — етанол 50% (2:1) 4:3 2. МКЦ: суміш екстракт — етанол 50% (2:1) 4:3
2	Екстракт зимолубки у перерахунку на сухий залишок	30,69	
3	Vivasol	3,00	
4	Магнію стеарат	1,00	

Модельний склад F1

Для складу F1 використовували суміш мікрокристалічної целюлози 101 (МКЦ 101) та нерозведеного зимолюбки зонтичної трави екстракту рідкого. Введення компонентів здійснювалось у два етапи. Перший етап: до 4 частин МКЦ 101 додавали 4 частини екстракту. Другий етап: до отриманого грануляту додавали ще 2 частини екстракту, після до отриманої суміші додавали Vivasol та магнію стеарат.

Отримана суміш мала достатню сипучість, забезпечуючи рівномірність складу. Проте на другому етапі введення екстракту спостерігалось незначне злипання грануляту, що потребувало додаткового перемішування.

Модельний склад F2

Для складу F2 використовували екстракт, розведений очищеною водою (у співвідношенні 2:1). Процес також проводили у два етапи. Перший етап: до 4 частин МКЦ 101 додавали 4 частини розведеної суміші екстракту; на другому етапі до грануляту додавали ще 2 частини розведеної суміші. Після проведення двох операцій гранулювання до суміші додавали Vivasol та магнію стеарат.

На першому етапі адсорбція рідини на МКЦ 101 була задовільною. Однак на другому етапі спостерігалось погіршення адсорбції через перенасичення МКЦ 101 вологою, що ускладнювало подальше введення розведеної суміші. Проведення третього етапу було визнано недоцільним через зниження технологічності процесу.

Модельний склад F3

Для складу F3 використовували розведений екстракт із водою (2:1), введений у два рівні етапи: на першому етапі до 4 частин МКЦ 101 додавали 3 частини розведеної суміші. На другому етапі, до грануляту додавали ще 3 частини розведеної суміші. Після проведення двох операцій гранулювання до суміші додавали Vivasol та магнію стеарат.

Під час другого етапу процесу спостерігалось злипання маси, що спричиняло прилипання грануляту до стінок чашки та ускладнювало змішування. Це свідчить про обмежену можливість введення великої кількості

рідини без погіршення сипучості грануляту.

Модельний склад 4

Для складу F4 використовували розведений екстракт із 50% етанолом (2:1). Процес проводився у два етапи. Перший етап: до 4 частин МКЦ додавали 3 частини суміші. Другий етап: до грануляту додавали ще 3 частини суміші. Після проведення двох операцій гранулювання до суміші додавали Vivasol та магнію стеарат.

На першому етапі отримали однорідний порошок, який мав задовільну сипучість та не злипався. Проте під час другого етапу спостерігалось помітне злипання грануляту, що вимагало інтенсивного перемішування. Незважаючи на це, використання етанолу покращувало розподіл екстракту у суміші порівняно з водою.

На основі отриманих результатів найбільш ефективною та технологічно доцільною є технологія складу F1. Цей склад забезпечує:

- Високий вміст екстрактивних речовин екстракту, необхідних для досягнення терапевтичного ефекту.
- Простоту процесу, мінімізацію технологічних етапів та збереження стабільності суміші.
- Незначне злипання грануляту, яке не впливає на якість кінцевого продукту.

Отже, для промислового застосування рекомендовано обрати склад F1, як оптимальний для отримання таблеток із зимолубки зонтичної трави екстрактом рідким.

4.5.4 Підбір складу допоміжних речовин таблеток із використанням методу математичного планування експеримента (МПЕ)

Підбір компонентів та умов приготування грануляту для формування таблеток із вмістом рослинної субстанції зимолубки здійснювався за допомогою методу математичного планування експерименту (МПЕ) [35, 105]. У дослідженні

використовувалися декілька груп допоміжних речовин та вологість, до якої проводили сушіння гранул після кожного з етапів гранулювання. Їх характеристика, рівні факторів і відсоткове співвідношення представлені в табл. 4.20. Варіація концентрації дезінтегранту Vivasol та антифрикційної речовини (магнію стеарат) відбувалась за рахунок кореляції кількості МКЦ 101.

Наведені перемінні були поділені на рівні факторів, що досліджувалися методом чотирифакторного експерименту на основі греко-латинського квадрата.

Таблиця 4.20

Фактори та їх рівні, які досліджувалися у процесі обґрунтування технології таблеток

Фактори	Рівні факторів
Вологість грануляту після 1 етапу гранулювання та сушки (А)	$a_1 - 2,0 \%$ $a_2 - 3,0 \%$ $a_3 - 4,0 \%$ $a_4 - 5,0 \%$
Вологість грануляту після 2 етапу гранулювання та сушки (В)	$b_1 - 2,0 \%$ $b_2 - 3,0 \%$ $b_3 - 4,0 \%$ $b_4 - 5,0 \%$
Дезінтегрант Vivasol (С)	$c_1 - 1,0 \%$ $c_2 - 2,0 \%$ $c_3 - 3,0 \%$ $c_4 - 4,0 \%$
Антифрикційна речовина Магнію стеарат (D)	$d_1 - 0,3 \%$ $d_2 - 0,5 \%$ $d_3 - 0,7 \%$ $d_4 - 1,0 \%$

В якості відгуків виступали такі показники грануляту та отриманих таблеток на із вмістом біологічно-активних сполук зимолюбки зонтичної:

- y_1 та y_1' – текучість маси для таблетування після опудрення, с/100 г (ДФУ 2.9.16);
- y_2 та y_2' – стираність таблеток (ДФУ 2.9.7), %

- u_3 та u_3' – розпадання таблеток (ДФУ 2.9.1), хв;
- u_4 та u_4' – стійкість таблеток до роздавлювання (ДФУ 2.9.8), Н;
- u_5 та u_5' – органолептичні показники таблеток, бали.

Фармако-технологічні показники отриманих гранулятів визначали згідно з методиками, описаними в ДФУ [11]. Органолептичні показники таблеток визначали за бальною характеристикою, де найвищий бал (5) мали таблетки, що мали оптимальні показники (відсутність сколів, тріщин, рівномірність кольору таблетки, стабільна маса). Результати досліджень фармако-технологічних показників якості грануляту та таблеток представлені в табл. 4.21.

За результатами проведених досліджень було побудовано діаграми впливу факторів та їх рівнів на фармако-технологічні та органолептичні властивості. На рис. 4.22 наведено вплив факторів на плинність маси для таблетування в залежності від кількості опудрюючого компонента – магнія стеарата.

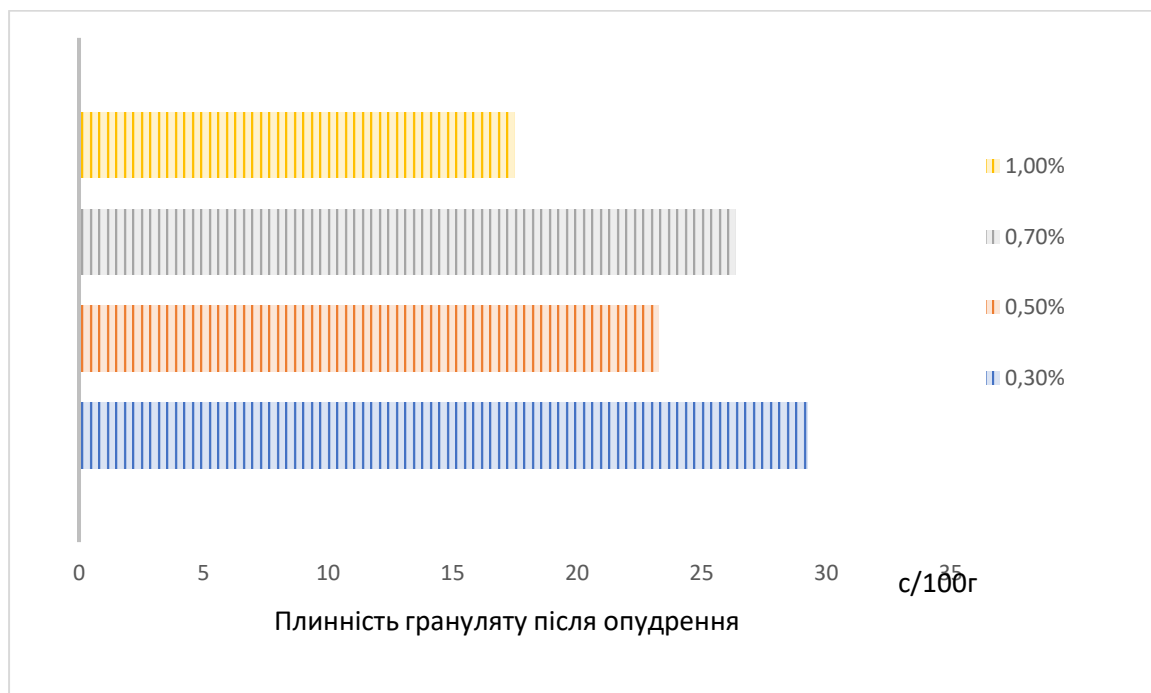


Рис. 4.22 Вплив магнія стеарату на плинність маси для таблетування

Згідно отриманих даних ефективною концентрацією в складі таблеткової маси є наявність 1,0 % магнія стеарата. При даній концентрації суміш відповідає рекомендованим показникам щодо плинності. Підвищення концентрації вище 1,0% не є доцільним та не рекомендується при використанні антифрикційних речовин у таблетковому виробництві.

Таблиця 4.21

Матриця планування експерименту отримання грануляту та таблеток з екстрактом зимоліюбки зонтичної

Фактори				Відгуки									
A	B	C	D	y ₁	y ₁ '	y ₂	y ₂ '	y ₃	y ₃ '	y ₄	y ₄ '	y ₅	y ₅ '
a ₁	b ₁	c ₁	d ₂	34	32	0,31	0,28	16	19	42	44	3	2
a ₂	b ₁	c ₄	d ₄	25	25	0,34	0,32	11	9	45	44	5	5
a ₃	b ₁	c ₃	d ₃	42	46	0,81	0,86	13	12	31	33	3	3
a ₄	b ₁	c ₂	d ₁	33	30	0,71	0,62	8	9	33	35	4	4
a ₁	b ₂	c ₂	d ₂	33	36	0,42	0,37	7	8	49	47	5	5
a ₂	b ₂	c ₃	d ₄	15	17	0,60	0,70	15	17	39	35	5	5
a ₃	b ₂	c ₄	d ₃	25	27	0,55	0,52	11	13	33	24	4	5
a ₄	b ₂	c ₁	d ₁	27	29	0,71	0,75	19	17	41	41	4	4
a ₁	b ₃	c ₃	d ₄	26	24	0,35	0,42	9	7	36	35	4	5
a ₂	b ₃	c ₂	d ₃	20	18	0,95	0,96	5	6	41	38	5	4
a ₃	b ₃	c ₁	d ₂	45	43	1,21	1,23	27	26	27	24	3	4
a ₄	b ₃	c ₄	d ₁	48	45	1,3	1,25	18	19	27	27	3	3
a ₁	b ₄	c ₄	d ₁	47	49	0,89	0,95	11	11	42	43	2	2
a ₂	b ₄	c ₁	d ₂	29	28	0,69	0,75	15	14	39	42	4	4
a ₃	b ₄	c ₂	d ₃	24	22	1,23	1,10	9	11	28	33	4	5
a ₄	b ₄	c ₃	d ₄	25	23	0,74	0,69	14	13	26	22	4	5

Вплив вологості грануляту на сипкість маси для таблетування наведено в таблиці 4.8. Згідно результатам проведених досліджень кращу за часом плинність має гранулят, що мав вологість після першого та другого етапу гранулювання 2,0% – 3,0%. Вплив кількості дезінтегранта не впливає на плинність таблеткової маси (табл. 4.22).

Таблиця 4.22

**Вплив факторів та їх рівнів на плинність маси для таблетування
після опудрення**

Фактор	Числовий показник, с/100 г	Пріоритети рівнів факторів (за мінімальним часом с ⁻¹)
Вологість грануляту після 1 етапу гранулювання та сушки (A)	32,625=28,500>18,125=17,125	$a_3=a_4>a_1=a_2$
Вологість грануляту після 2 етапу гранулювання та сушки (B)	28,625=26,250=24,000>17,500	$B_3=B_1=B_4>B_2$
Дезінтегрант Vivasol (C)	26,125=25,250=22,750=22,250	$c_4=c_1=c_2=c_3$
Антифрикційна речовина магнію стеарат (D)	29,250=26,375=23,250>17,500	$d_1=d_3=d_2>d_4$

За результатами проведених дослідження по визначенню впливу вологості гранулята після етапів гранулювання, наявності дезінтегранта та кількості магнія стеарата було визначено, що:

- стиранність таблеток у більшому ступеню залежить від вологості грануляту та кількості дезінтегранта. Оптимальним є 3,0% вологість грануляту
- після кожного з етапів гранулювання;
- розпадання та стійкість таблеток до роздавлювання залежить від кількості дезінтегранта та вологості гранулята. Наявність в складі лікарського

засобу 2,0% дезінтегранта дозволяє отримати таблетки із оптимальними показниками по розпаданню та стійкості.

На органолептичні показники впливають усі фактори, що були задіяні при проведенні досліджень. Наявність 1,0 % магнія стеарата, 2,0 % Vivasol та проведення процесу сушіння на кожному з етапів до вологості 3,0% дозволяє отримати таблетки, що мають найвищий бал за органолептичними показниками (табл. 4.23).

Таблиця 4.23

Ранжування рівнів факторів за показниками модельних зразків

Фактори	Фармако-технологічні показники	Розмірність	Ранжування рівнів факторів	Оптимальний рівень фактору
1	2	3	4	5
Вологість грануляту після 1 етапу гранулювання та сушки (А)	плинність маси для таблетування після опудрення	с/100г	$a_3=a_4>a_1=a_2$	$\underline{a_2}, a_1$
	стираність таблеток	%	$a_3=a_4>a_2>a_1$	$a_1, \underline{a_2}$
	розпадання таблеток	хв	$a_3=a_4>a_2=a_1$	$a_1, \underline{a_2}$
	стійкість таблеток до роздавлювання	Н	$a_1=a_2>a_4=a_3$	$a_1, \underline{a_2}$
	органолептичні показники таблеток	бали	$a_2>a_3=a_4=a_1$	$\underline{a_2}, a_3$
Вологість грануляту після 2 етапу гранулювання та сушки (В)	плинність маси для таблетування після опудрення	с/100г	$b_3=b_1=b_4>b_2$	$\underline{b_2}, b_4$
	стираність таблеток	%	$b_3=b_4>b_2=b_1$	$b_1, \underline{b_2}$
	розпадання таблеток	хв	$b_3=b_2=b_4=b_1$	b_1, b_4
	стійкість таблеток до роздавлювання	Н	$b_2=b_1>b_4=b_3$	$\underline{b_2}, b_1$
	органолептичні показники таблеток	бали	$b_2>b_3=b_4=b_1$	$\underline{b_2}, b_3$

Продовж. табл. 4.23

1	2	3	4	5
Дезінтегрант Vivasol (C)	плинність маси для таблетування після опудрення	с/100г	$c_4=c_1=c_2=c_3$	<u>c₂</u> , c ₃
	стираність таблеток	%	$c_2=c_4=c_1>c_3$	c ₃ , c ₁
	розпадання таблеток	хв	$c_1>c_4=c_3>c_2$	<u>c₂</u> , c ₃
Фактори	Фармако- технологічні показники	Розмірність	Ранжування рівнів факторів	Оптимальний рівень фактору
	стійкість таблеток до роздавлювання	Н	$c_2=c_1=c_4>c_3$	<u>c₂</u> , c ₁
	органолептичні показники таблеток	бали	$c_2=c_3>c_4=c_1$	<u>c₂</u> , c ₃
Антифрикційна речовина магнію стеарат (D)	плинність маси для таблетування після опудрення	с/100г	$d_1=d_3=d_2>d_4$	<u>d₄</u>
	стираність таблеток	%	$d_1=d_3>d_2>d_4$	d ₂ , <u>d₄</u>
	розпадання таблеток	хв	$d_2>d_1>d_4=d_3$	<u>d₄</u> , d ₃
	стійкість таблеток до роздавлювання	Н	$d_2>d_1=d_4>d_3$	d ₂ , d ₁ , <u>d₄</u>
	органолептичні показники таблеток	бали	$d_4>d_3>d_2>d_3$	<u>d₄</u> , d ₃

Аналіз рівнів факторів, що впливають на фармако-технологічні та органолептичні показники таблеток і таблеткової маси показує, що для отримання оптимального складу твердої лікарської форми у вигляді таблетки із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким ефективним є використання дезінтегранту Vivasol 2,0 % (c₂) та антифрикційної речовини магнію стеарату 1,0% (d₄). Процес сушіння грануляту після першого та повторного гранулювання необхідно проводити до остаточної вологи 3,0% (відповідно a₂, b₂). Використання запропонованої концентрації ексципієнтів та технології сушіння дозволить отримати таблетки, що відповідатимуть

показникам ДФУ за фармако-технологічними властивостями.

За результатами проведених досліджень було запропоновано склад таблеток (рис. 4.23) із вмістом екстракту зимоліюбки [68]:

Склад таблеток, %:

Мікрокристалічна целюлоза 101 -	56,89
Рідкий екстракт зимоліюбки з вмістом сухих речовин 47,0% (у перерахунку на екстрактивні речовини) -	40,11
Vivasol -	2,00
Магнію стеарат -	1,00
Всього	100,00



Рис. 4.23 Зовнішній вигляд таблеток із вмістом зимоліюбки зонтичної трави екстрактом рідким

4.5.5 Технологічна схема виробництва таблеток із використанням методу подвійного гранулювання у промислових умовах

Наявність технологічної схеми виробництва таблеток на фармацевтичному підприємстві є критично важливою, оскільки вона забезпечує якість, ефективність та безпеку лікарського засобу, а також відповідність виробництва вимогам належної виробничої практики (GMP) [26].

Технологічна схема дозволяє структурувати та стандартизувати процес

виробництва, що допомагає уникнути відхилень, зменшити ймовірність помилок та підвищити відтворюваність процесу; забезпечує контроль якості на кожному етапі, що дозволяє своєчасно виявляти та усувати можливі дефекти, такі як нерівномірний розподіл активної речовини, неправильна твердість чи тривалість розпаду таблетки.

Крім того, технологічна схема є необхідною для відповідності нормативним вимогам фармакопеї та регуляторних органів. Вона допомагає документувати весь виробничий процес, що є важливим при перевірках з боку контролюючих органів та для подальшого вдосконалення технології.

Таким чином, технологічна схема є ключовим документом, що гарантує стабільність виробництва, високу якість таблеток та відповідність стандартам фармацевтичного виробництва.

На підприємстві, після проведення комплексу робіт із підготовки приміщення, персоналу, устаткування, першою стадією виробничого процесу є Стадія 1 Підготовка сировини.

Стадія 1 Підготовка сировини (рис. 4.24)

Здійснюється візуальна перевірка речовин і матеріалів, а також їх ідентифікація із зазначенням назви, номера партії та коду. У виробничому приміщенні проводиться зважування діючої та допоміжних речовин у розрахунку на одну серію лікарського засобу відповідно до виробничої рецептури.

Просіювання виконується наступним чином: мікрокристалічна целюлоза (МКЦ 101) – через сито з розміром отворів ($0,5 \pm 0,05$) мм, магнію стеарат, Vivasol – через сито з розміром отворів ($0,2 \pm 0,03$) мм.

Рідкий екстракт зимолобки зважується, та досліджується на вміст екстрактивних речовин.

Стадія 2 Перший етап гранулювання

У відповідних пропорціях при перемішуванні імпелером в поліфункціональному змішувачі-грануляторі змішували МКЦ 101 та рідкий

екстракт зимолюбки. Отриману вологу масу подрібнювали за допомогою чоппера та висушували за рахунок нагрівання сорочки змішувача-гранулятора із підключеним вакуумом. Отримані гранули калібрували (1,0 мм) вбудованим пристроєм калібровки в збірник.

Стадія 3 Другий етап гранулювання

За розрахованим прописом, до попередньо отриманих сухих каліброваних гранул, завантажених із збірника в змішувач-гранулятор, додавали рідкий розчин екстракта зимолюбки. Отриману масу перемішували, подрібнювали чоппером та висушували до остаточної вологості 3,0%. При отриманні даних щодо відповідності отриманого гранулята вологості – гранули калібрували в збірник.

Стадія 4 Опудрення гранул

Гранули, отримані на стадії 3, поміщали до V-подібного змішувача, додавали суміш Vivasol і магнія стеарата і проводили опудрювання. Отримані опудрені гранули передавали на Стадію 5 Таблетування.

Стадія 5 Таблетування

Отриманий гранулят піддається пресуванню на роторному таблетковому пресі, який, окрім формування таблеток, забезпечує їх знепилювання та автоматичний контроль середньої маси. Маса для таблетування завантажується у бункер пресу, де попередньо встановлено прес-інструмент для формування таблеток діаметром 10 мм. Необхідна маса таблетки задається через пульт керування. Після цього здійснюється процес таблетування та знепилювання, а готові таблетки спрямовуються у збірник. Контроль напівпродуктів проводиться згідно з технологічною схемою виробництва та відповідними специфікаціями. Знепилені таблетки у збірнику передають на стадії фасування та пакування таблеток, після чого пакована продукція передається на карантинний склад та склад готової продукції.



Рис. 4.24 Технологічна блок-схема виробництва таблеток

Висновки до розділу 4

1. Визначено показники якості трави зимолюбки зонтичної: втрата в масі при висушуванні ($7,15 \pm 0,11$ %), зола загальна ($2,90 \pm 0,10$ %), зола, не розчинна у кислоті хлористоводневій ($1,10 \pm 0,12$ %), вміст сторонніх домішок ($3,89 \pm 0,18$ %) та технологічні параметри сировини: ступінь подрібнення сировини; питома поверхня часток сировини; поглинання сировиною екстрагента; питома, об'ємна та насипна маси, пористість і нарізність, вільний об'єм шару сировини.
2. Визначено вміст екстрактивних речовин. Найбільший вихід екстрактивних речовин з трави зимолюбки зонтичної визначений при екстрагуванні трави 50 % етанолом ($29,11 \pm 1,02$ %) та 70 % етанолом ($27,05 \pm 1,11$ %). У найменшій кількості екстрактивні речовини вилучались водою ($23,12 \pm 1,04$ %) та 96 % етанолом ($21,14 \pm 1,13$ %). За результатами експериментальних даних, оптимальним співвідношенням сировина:екстрагент запропоновано 1:5.
3. Отримано рідкий екстракт зимолюбки зонтичної трави та визначено параметри його стандартизації: опис, розчинність, ідентифікація флавоноїдів кислот методом ТШХ, вміст важких металів, вміст сухого залишку, вміст етанолу, мікробіологічна чистота, кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (становив не менше 1,5 %).
4. Досліджено вплив екстракту зимолюбки на клітинні культури лінії L929 (фібробласти жирової тканини миші). Визначення мінімальної токсичної концентрації оцінювали за морфологічними ознаками клітин і встановили, що екстракт зимолюбки у концентраціях 0,05; 0,02, 0,01; 0,005 % не мав токсичного впливу на клітини L929. Найбільш чутливими до дії екстракту виявились міграційна та проліферативні функції клітин, менш чутливими – енергетична, піноцитозна та збереження морфологічної цілісності.
5. В умовах розвитку ниркової недостатності у щурів екстракт зимолюбки зонтичної покращував фізичний стан тварин, зменшував їхню смертність,

покращував видільну функцію нирок, нормалізував азотистий й білковий обмін, сприяв захисту структури ниркової тканини, а отже, мав позитивний вплив на перебіг нефропатії. В експериментальних дослідженнях екстракт зимолоубки мав виражену нефропротекторну й гіпоазотемічну дію і може бути перспективним засобом для лікування хронічної хвороби нирок.

6. Досліджено вплив екстракту трави зимолоубки на структурно-функціональний стан нирок у щурів. Встановлено, що екстракт трави зимолоубки зонтичної сприяв захисту морфоструктури ниркової тканини щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю, знижуючи ступені ураження ниркових тілець та каналців. За виразністю нефропротективних властивостей екстракт зимолоубки зонтичної поступався референс-препарату розчину леспефрину за впливом на стан гломерулярного апарату та випереджав його за впливом на стан каналцевої системи.
7. Досліджено протизапальні властивості екстрактів трави зимолоубки зонтичної, водного, 50 % етанольного та 70 % етанольного на моделі карагенінового набряку стопи у лабораторних щурів. Усі досліджувані зразки продемонстрували статистично значущий ефект на 3 год дослідження. Для подальших поглиблених досліджень за показником протизапальної активності можуть бути рекомендовані екстракти, отримані 50 % та 70 % етанолом у дозі 1 мл/кг, що продемонстрували усереднену протизапальну активність на відповідному рівні.
8. Досліджено антимікробну дію екстракту трави зимолоубки методом колодязів на середовищі Мюллера-Хінтона. Встановлено, що екстракт трави зимолоубки зонтичної проявляє антибактеріальні властивості до тестових мікроорганізмів (діаметри зон затримки росту 20-28 мм) та клінічних штамів мікроорганізмів (діаметри зон затримки росту 19-24 мм).
9. Розроблено технологію отримання таблеток з екстрактом зимолоубки зонтичної методом подвійного гранулювання при використанні мікрокристалічної целюлози 101 (MCC 101). Методом математичного

планування експерименту підібрані умови сушіння грануляту та кількісний склад ексципієнтів. Технологія отримання таблеток включала проведення двоетапного процесу гранулювання маси. При проведенні сушіння, після кожного з етапів, гранулят був висушений до наявності вологи не більше 3,0%. Експериментально підтверджено оптимальний склад таблеток із вмістом рідкого екстракта зимолоубки: МКЦ – 56,89%; Рідкий екстракт зимолоубки (з вмістом сухих речовин 47,0%) – 40,11%; Vivasol – 2,0%; магнію стеарат – 1,0%

Результати експериментальних досліджень розділу наведено у таких публікаціях:

1. Коврегін О. В., Литкін Д. В., Владимірова І. М., Юдкевич Т. К. Скринінгові дослідження протизапальної активності екстрактів із зимолоубки зонтичної трави. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2024. № 3(59). С. 42-46.
2. Kovregin O., Soldatov D., Kukhtenko O., Vladymyrova I. Development of technology for obtaining tablets by double granulation method with Pipsissewa (*Chimaphilla Umbellata*) extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. № 6(52). С. 124–133. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.318519
3. Kovregin O. V., Osolodchenko T. P., Vladymyrova I. M. The Study of the Antibacterial Effect of the Umbellate Wintergreen Extract. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2024, 22 (4). P. 43-47. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.24.324652>
4. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Скринінгові дослідження протизапальних властивостей водного екстракту зимолоубки лікарської. Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали XXX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 17-19 квіт. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 64-65.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено експериментальне вирішення наукової задачі, що полягає у фармакогностичному дослідженні трави зимолюбки зонтичної та розробці параметрів її стандартизації, одержанню на основі сировини фітозасобів та їх стандартизації, дослідженню їх фармакологічних властивостей.

1. Проаналізовано відомості наукової літератури щодо ботанічної характеристики, хімічного складу та фармакологічних властивостей зимолюбки зонтичної, що зростає в Україні. Обґрунтована актуальність проведення досліджень сировини та створення на її основі фітозасобів з нефропротекторними, протизапальними, антимікробними та антиоксидантними властивостями.
2. У трави зимолюбки зонтичної методом ВЕТШХ ідентифіковано фенольні сполуки: гіперозид (R_f 0.41), авікулярин (R_f 0.67), ізокверцетин (R_f 0.45), галову (R_f 0.81), кофейну кислоти (R_f 0.87). Методом ВЕРХ кількісно визначені 8 фенольних сполук – апігенін, гіперозид, кверцитрин, рутин, кверцетин, галова кислота, гуаяверин та ізокверцетин. У найбільших кількостях містились рутин ($4,16 \pm 0,07$ %), гуаяверин ($3,99 \pm 0,08$ %) та гіперозид ($3,71 \pm 0,06$ %). Методом ГХ-МС визначений вміст 7 амінокислот, з яких 3 є незамінними – L-валін, ізолейцин, L-лейцин. У найбільшій кількості міститься L-глутамінова кислота (14,469 мкг/г), у найменшій – L-лейцин (0,050 мкг/г). методом атомно-емісійної спектрографії визначено вміст 14 макро- та мікроелементів. Серед елементів з найбільшим вмістом (мкг/100г) слід відзначити натрій (862,00), калій (1368,00), сіліцій (420,00), магній (231,00), фосфор (125,00); серед мікроелементів: кальцій (530,00), манган (18,00), ферум (9,00).
3. Методом ГХ-МС у траві зимолюбки зонтичної визначено 21 речовину, що переганяється з водяною парою. Був встановлений вміст спиртів (гексанол-3, октанол-3), альдегідів, ацеталів і кетонів (гексаналь, октанон-3,

гексагідрофарнезилацетон), терпеноїди (β -бурбонен, β -елемен, α -селінен, γ -кадінен, каламенен, дигідроактинідіолід, спатуленол, каріофіленоксид), алканів (тетрадекан), похідних ароматичних карбонових кислот (фталат), фенольних сполук (флавіон), алканів (гептакозан, нонакозан), алкадієнів (1,21-докозадієн), фітостеринів (γ -ситостерол).

4. Уперше досліджено мікроскопічні діагностичні ознаки трави зимоліубки зонтичної. Листок *Chimaphilla umbellata* дорзовентральний, гіпостоматичний. На поверхні, як адаксіальній так і абаксіальній епідерми виражено залягають шари кутику, наявність якого підтвердили і гістохімічні реакції. Тип анатомічної будови стебла – безпучковий. Стебло вкрите перидермою з неоднорідним верхнім рядом клітин, залишків епідерми, зовнішня поверхня якої має добре розвинений кутикулярний шар, типовий для ксерофільних рослин, з бородавчастими, сосочкоподібними трихомами. Проведені гістохімічні реакції з сировиною трави зимоліубки зонтичної свідчать про наявність таких біологічно активних речовин як: арбутин, таніни, ліпіди, воскоподібні речовини (кутин), лігнін.
5. Уперше визначені параметри стандартизації трави зимоліубки зонтичної: макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, ідентифікація методом ТШХ (визначення флавоноїдів – рутину та гіперозиду), визначення вмісту важких металів, втрата в масі при висушуванні (не більше 10 %), зола загальна (не більше 5 %), зола, не розчинна в хлористоводневій кислоті (не більше 2,5 %), мікробіологічна чистота, сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (не менше 1,0 %) та технологічні параметри сировини: ступінь подрібнення сировини; питома поверхня часток сировини; поглинання сировиною екстрагента; питома, об'ємна та насипна маси, пористість і нарізність, вільний об'єм шару сировини.
6. Визначено вміст екстрактивних речовин. Найбільший вихід екстрактивних речовин з трави зимоліубки зонтичної визначений при екстрагуванні трави

50 % етанолом ($29,11 \pm 1,02$ %) та 70 % етанолом ($27,05 \pm 1,11$ %). У найменшій кількості екстрактивні речовини вилучались водою ($23,12 \pm 1,04$ %) та 96 % етанолом ($21,14 \pm 1,13$ %). За результатами експериментальних даних, оптимальним співвідношенням сировина:екстрагент запропоновано 1:5 та екстрагент – 50 % етанол. Отримано рідкий екстракт зимолюбки зонтичної трави та визначено параметри його стандартизації: опис, розчинність, ідентифікація флавоноїдів кислот методом ТШХ, вміст важких металів, вміст сухого залишку, вміст етанолу, мікробіологічна чистота, кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (становив не менше 1,5 %).

7. Уперше досліджено вплив екстракту зимолюбки на клітинні культури лінії L929 (фібробласти жирової тканини миші) та встановлена відсутність токсичної дії. В експериментальних дослідженнях на щурах екстракт зимолюбки мав виражену нефропротекторну й гіпоазотемічну дію, покращував видільну функцію нирок, нормалізував азотистий й білковий обмін, сприяв захисту структури ниркової тканини; сприяв захисту морфоструктури ниркової тканини щурів з хромат-індукованою нирковою недостатністю, знижуючи ступені ураження ниркових тілець та каналців. Досліджено протизапальні властивості екстрактів трави зимолюбки зонтичної, водного, 50 % етанольного та 70 % етанольного на моделі карагенінового набряку стопи у лабораторних щурів. Для подальших поглиблених досліджень можуть бути рекомендовані екстракти, отримані 50 % та 70 % етанолом у дозі 1 мл/кг. Встановлено, що екстракт трави зимолюбки зонтичної проявляє антибактеріальні властивості до тестових мікроорганізмів (діаметри зон затримки росту 20-28 мм) та клінічних штамів мікроорганізмів (діаметри зон затримки росту 19-24 мм).
8. Уперше розроблено технологію отримання таблеток з екстрактом зимолюбки зонтичної методом подвійного гранулювання при використанні мікрокристалічної целюлози 101 (MCC 101). Методом

математичного планування експерименту підібрані умови сушіння грануляту та кількісний склад ексципієнтів. Технологія отримання таблеток включала проведення двоетапного процесу гранулювання маси. При проведенні сушіння, після кожного з етапів, гранулят був висушений до наявності вологи не більше 3,0%. Експериментально підтверджено оптимальний склад таблеток із вмістом рідкого екстракта зимолюбки: МКЦ – 56,89%; Рідкий екстракт зимолюбки (з вмістом сухих речовин 47,0%) – 40,11%; Vivasol – 2,0%; магнію стеарат – 1,0%.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аланін. Велика українська енциклопедія. URL: <https://vue.gov.ua/Аланін> (дата звернення: 20.01.2025).
2. Біологічна і біоорганічна хімія : у 2–х кн. Кн. 1. Біоорганічна хімія : підруч. / Б. С. Зіменковський та ін. 3–тє вид. Київ : Медицина, 2022. 272 с.
3. Вивчення амінокислотного складу трави зимолубки зонтичної (*Chimáphila umbelláta* L.) / О. В. Коврегін та ін. Фармацевтичний журнал. 2024. Т. 79, № 4. С. 63–71. DOI: 10.32352/0367-3057.4.24.06.
4. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рек. / Ю. Л. Волянський та ін. Київ, 2004. 38 с.
5. Вивчення фенольних речовин у траві маруни дівочої методом тонкошарової хроматографії та високоефективної рідинної хроматографії / К. Р. Гордей та ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 3(60). С. 64–70.
6. Войцехівська О. В. Фенольні сполуки: різноманіття, біологічна активність, перспективи застосування / О. В. Войцехівська, О. В. Ситар, Н. Ю. Таран // Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Серія “Біологія”. – 2015. – Вип. 1 (34). – С. 104–119.
7. Гонський Я. І., Максимчук Т. П. Біохімія людини : підручник. 3–тє вид., випр. і допов. Тернопіль : Укрмедкнига, 2019. 732 с.
8. Горобець А. О. Вітаміни і мікроелементи як специфічні регулятори фізіологічних та метаболічних процесів в організмі дітей та підлітків. Перинатологія і Педіатрія. 2019. № 4(80). С. 75–92.
9. Демидяк О. Л. Дослідження вмісту амінокислот у квітках хризантеми низькорослої *Chrysanthemum Xhortorum* Bailey. *Фармацевтичний журнал*. 2014. № 5. С. 77–82.
10. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»,

2014. Т. 2. 724 с.

11. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
12. Державна Фармакопея України. Доповнення 4 / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків : РІРЕГ, 2011. 536 с.
13. Дизайн експерименту при проведенні досліджень зі створення таблетованих лікарських засобів. Повідомлення 4. Використання методу “Якість шляхом розробки” (QbD) при оптимізації складу та технології таблетованих лікарських засобів / Т. А. Грошовий та ін. *Фармацевтичний часопис*. 2021. № 2. С. 97–108. DOI: 10.11603/2312-0967.2021.2.12153.
14. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. член-кор. АМН України О. В. Стефанова. Київ : Авіцена, 2001. 528. с.
15. Доля В. С., Книш С. Г., Мозуль В. І. Мікроскопічний та мікрохімічний аналіз лікарської рослинної сировини. Запоріжжя, 2003. 98 с.
16. Ідентифікація фенольних сполук зимолоубки зонтичної методом високоефективної тонкошарової хроматографії / О. В. Коврегін та ін. *Health & Education*. 2024. № 3. Р. 58–63. DOI: 10.32782/health-2024.3.7.
17. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Леспефрил» (Lespefril). Нормативно-директивні документи МОЗ України. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=52052> (дата звернення: 20.01.2025).
18. Іосипенко О. О., Кисличенко В. С., Омельченко З. І. Вивчення амінокислотного складу листя кабачків. *Медична та клінічна хімія*. 2020. Т. 22, № 2. С. 72–80.
19. Климнюк С. І., Ситник І. О., Широбоков В. П. Практична мікробіологія : навч. посіб. Вінниця : Нова книга, 2018. 576 с. DOI: 10.11603/1681-2727.2019.2.10332.
20. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення мінерального складу

- зимолюбки зонтичної трави. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали V Міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 23-25 листоп. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 73–74.
21. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення показників якості зимолюбки зонтичної трави. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXIX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 19-21 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 46–47.
22. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична як перспективний вид лікарської рослинної сировини. *Youth Pharmacy Science* : матеріали II Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 груд. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 61–62.
23. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична: лікувальні властивості та застосування у медицині. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 42.
24. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Скринінгові дослідження протизапальних властивостей водного екстракту зимолюбки лікарської. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : матеріали XXX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, м. Харків, 17-19 квіт. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 64–65.
25. Коврегін О., Махиня Л., Владимірова І. Мікроскопічні та гістохімічні дослідження трави зимолюбки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* (L.) W. Barton). *Фітотерапія. Часопис*. 2024. № 4. С. 224–231. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-4-224.
26. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. [електронний ресурс]. Київ : МОЗ України, 2011. Режим доступу: URL: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-0-2011/> (дата звернення: 20.01.2025).

27. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник / відп. ред. А. М. Гродзінський. Київ : Українська енциклопедія ім. М. П. Бажана : Олімп, 1992. 544 с.
28. Лікарські рослини і фітотерапія. Фітотерапевтична рецептура : навч. посіб. (ВНЗ IV р. а.) / Л. В. Бензель та ін. Київ : Медицина, 2010. 400 с.
29. Макро- та мікроелементи (обмін, патологія та методи визначення) : монографія / М. В. Погорелов та ін. Суми : СумДУ, 2010. 147 с.
30. Маслов О., Комісаренко М., Горопашна Д., Колісник С., Деримедвідь Л., Комісаренко А. (2024). Теоретичне та практичне розроблення хімічного складу та технології виробництва екстракту листя *Rubus idaeus* із меглюміном, який має протизапальну дію. *Фітотерапія. Часопис*, 4, 143–155, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-4-143>
31. Методи експериментального моделювання ураження нирок для фармакологічних досліджень : метод. рек. / С. Ю. Штриголь та ін. Харків : НФаУ, 2009. 48 с.
32. Морфофункціональні особливості фібробластів лінії L929 в умовах 3D-культивування / Г. А. Божок та ін. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3. С. 34–40.
33. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін та ін. Київ : Авіцена, 2002. 156 с.
34. Нутриціологія : навч. посіб. / Н. В. Дуденко та ін. Харків : Світ Книг, 2013. 560 с.
35. Обґрунтування вибору допоміжних речовин при розробці складу таблеток «Пастинокард» / Н. А. Симоненко та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2023. Т. 16, № 3(43). С. 236–243.
36. Основи фармакогнозії і фітотерапії : навч. посіб. / за заг. ред. Т. П. Гарник, В. М. Князнвича, В. А. Туманова. Київ : Гельветика, 2015. 456 с.
37. Павлоцька Л. Ф., Аксьонова О. Ф., Скуріхіна Л. А. Нутриціологія та

- харчова безпека : навч. посіб. Харків : ХДУХТ, 2020. 132 с.
- 38.Перспективи застосування нефропротекторів рослинного походження на основі леспедези двоколірної / Г. В. Зайченко та ін. *Сімейна медицина. Європейські практики*. 2024. № 1. С. 55–61.
 - 39.Перцев І. М., Дмитрієвський Д. І., Рибачук В. Д. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність : навч. посіб. для студентів вищ. фармацевт. навч. закл. Харків : НФаУ, 2010. 600 с.
 - 40.Пороннік О.О., Кузьменко А.В., Воловик А.В., Швачко Л.В., Войцехівська О.В., Мирюта Г.Ю., Рубан Т.А., Парнікоза І.Ю., Кунах В.А. Клоновані *in vitro* рослини роду *Deschampsia* як джерело фенольних сполук з протипухлинними властивостями // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 200-204.
 - 41.Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини : навч. посіб. / В. М. Ковальов та ін. Тернопіль : ТДМУ, 2014. 264 с.
 - 42.Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05.04.2007 р. № 167. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text> (дата звернення: 20.01.2025).
 - 43.Промислова технологія лікарських засобів : базовий підруч. для студентів вищ. навч. фармацевт. закл. (фармацевт. ф-тів) / Є. В. Гладух та ін. 2–ге вид., випр. та допов. Харків : НФаУ : Новий світ 2000, 2018. 486 с.
 - 44.Скринінгові дослідження протизапальної активності екстрактів із зимолоубки зонтичної трави / О. В. Коврегін та ін. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2024. № 3(59). С. 42–46.
 - 45.Сучасна фітотерапія : навч. посіб. / С. В. Гарна та ін. Харків : Друкарня Мадрид, 2016. 580 с.
 - 46.Сучасні лікарські засоби для фітотерапії: погляд лікаря та фармацевта / І.

- А. Зупанець та ін. *Український медичний часопис*. 2023. № 6(158). С. 3–8. DOI: 10.32471/umj.1680-3051.158.249269.
47. Товчига О. В., Штриголь С. Ю., Баля О. А. Вплив екстракту та настойки яглиці звичайної (*Aegorodium podagraria* L.) на поведінкові реакції мишей на тлі введення кофеїн-бензоату натрію. *Клінічна фармація*. 2018. Т. 22, № 3. С. 29–37.
48. Фітотерапевтичні лікарські засоби з нефропротекторною активністю (огляд) / О. А. Подплетня та ін. *Медичні перспективи*. 2017. № 1(22). С. 10–19.
49. Чекман І. С. Клінічна фітотерапія. Київ : А.С.К., 2003. 550 с.
50. Чорна І. В. Структурно-функціональний стан нирок щурів двох поколінь при вживанні гліфосат-резистентної генетично модифікованої сої та гербіциду «Roundup». *ScienceRise: Biological Science*. 2019. № 1(16). Р. 25–29. DOI: 10.15587/2519-8025.2019.160170.
51. Шерстюк М. Ю. Аналіз віталітетної структури ценопопуляцій *Chimaphilla umbellata* (L.) у лісових фітоценозах Новгород-Сіверського полісся. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 1(4). Р. 40–45.
52. A Review on Lquisolid: A Novel Technique for Enhancement of Solubility and Bioavailability of Poorly Water-Insoluble Drugs / A. C. Ezegbe et al. *Science Frontiers*. 2023. Vol. 4(2). Р. 17–24. DOI: 10.11648/j.sf.20230402.11.
53. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates / R. Mogana et al. *BMC Complement Med Ther*. 2020. Vol. 20(1). Р. 55. DOI: [10.1186/s12906-020-2837-5](https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5).
54. Antifungal and antioxidant activities of the phytomedicine pipsissewa, *Chimaphilla umbellata* / J. Galván et al. *Phytochemistry*. 2008. Vol. 69(3). Р. 738–746. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.09.007.

55. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada / J. Vandal et al. *Pharm. Biol.* 2015. Vol. 53(6). P. 800–806. DOI: 10.3109/13880209.2014.942867.
56. Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions / D. Chrpova et al. *Czech. J. Food Sci.* 2010. Vol. 28. P. 317–325. DOI: 10.17221/129/2010-CJFS.
57. Biochemistry and Medical Genetics : Lecture Notes / ed. S. Turco, R. Lane, R. M. Harden. New York : Kaplan, 2019. 409 p.
58. Changes in biochemical parameters of nitrogen renal function of rats with long-term administration of therapeutic doses of nalbuphine / I. V. Vilkhova et al. *Bulletin of Medical and Biological Research.* 2021. Vol. 1(7). P. 54–61. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2021.1.12088.
59. Chemical constituents of *Chimaphilla japonica* Miq / Yu. Yue et al. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2021. Vol. 95. P. 104219. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104219.
60. Chemical constituents of *Chimaphilla japonica* Miq / Yu. Yue et al. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2021. Vol. 95. P. 104219. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104219.
61. *Chimaphilla umbellata* extract exerts anti-proliferative effect on human breast cancer cells via RIP1K/RIP3K-mediated necroptosis / N. Das et al. *Phytomedicine Plus.* 2022. Vol. 2(1). P. 3–10. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100159.
62. *Chimaphilla umbellata*; a biotechnological perspective on the coming-of-age prince's pine / U. Ali et al. *Phytochem. Rev.* 2023. Vol. 8. P. 1–16. DOI: 10.1007/s11101-023-09880-1.
63. Chimaphilin inhibits human osteosarcoma cell invasion and metastasis through suppressing the TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition markers via PI-3K/Akt, ERK1/2, and Smad signaling pathways / F. Dong, et al. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2018. Vol. 96(1). P. 1–7. DOI: 10.1139/cjpp-2016-0522.

64. Chronic heart failure in adults: diagnosis and management. Published: 12 September 2018. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng106/resources/chronic-heart-failure-in-adults-diagnosis-and-management-pdf-66141541311685> (Date of access: 20.01.2025).
65. Comparative Investigation of Amino Acids Content in the Dry Extracts of *Junobucharica*, *Gladiolus Hybrid Zefir*, *Iris Hungarica*, *Iris Variegata* and *Crocus Sativus* Raw Materials of Ukrainian Flora / O. Mykhailenko et al. *Sci. Pharm.* 2020. Vol. 88(8). P. 8. DOI: 10.3390/scipharm88010008.
66. Constituents of *Chimaphilla japonica* and Their Diuretic Activity / Yu. Yue et al. *Molecules*. 2024. Vol. 29(5). P. 1092. DOI: 10.3390/molecules29051092.
67. Crozier A., Clifford M., Ashihara H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2006. 384 p. DOI: 10.1002/9780470988558.
68. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers / M. Marksa et al. *Nat. Prod. Res.* 2016. Vol. 30(5). P. 536–543. DOI: 10.1080/14786419.2015.1027703.
69. Development of technology for obtaining tablets by double granulation method with *Pipsissewa* (*Chimaphila Umbellata*) extract / O. Kovregin et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. № 6(52). P. 124–133. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.318519.
70. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation. Rome : FAO, 2013. 66 p. URL: <http://www.fao.org/3/a-i3124e.pdf> (Date of access: 20.01.2025).
71. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *OJEU*. 2010. Vol. L276. P. 33–79.
72. Diuretic and natriuretic activity of two mistletoe species in rats / N. Jadhav et al. *Pharmacognosy Res.* 2010. Vol. 2(1). P. 50–57. DOI: 10.4103/0974-8490.60576.

73. Doxazosin downregulates sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) and exerts a renoprotective effect in rat models of acute renal injury / S. Rezaei et al. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2020. Vol. 126(5). P. 413–423. DOI: 10.1111/bcpt.13371.
74. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays / ed. H. G. Vogel. 3rd edition. Berlin : Springer–Verlag, 2008. 2071 p.
75. Effiong D. E., Onunkwo G. C. Principles, Applications and Limitations of the Liquefied System of Drug Delivery: A Review. *Trends in Medical Research*. 2024. Vol. 19(1). P. 178–198. DOI: 10.3923/tmr.2024.178.198.
76. Faster to First-time-in-Human: Prediction of the liquid solid ratio for continuous wet granulation / A. Junnila et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2022. Vol. 172. P. 106151. DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106151.
77. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / H. Wang et al. *Lancet*. 2016. Vol. 388. P. 1459–1544.
78. Grams M. E., Levey S. A., Coresh J. Epidemiology of Kidney Disease. *Brenner and Rector's The Kidney* / eds. A. S. L. Yu. et al. 11th ed. Philadelphia : Elsevier, 2020. Vol. 1. P. 616–639.
79. Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC / P. Ponikowski et al. *Eur. Heart J.* 2016. Vol. 37(27). P. 2129–2200. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw128.
80. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment / E. Safarzadeh et al. *Adv. Pharm Bull.* 2014. Vol. 4(1). P. 421–427. DOI: 10.5681/apb.2014.062.

- 81.Hulkower K. I., Herber R. L. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*. 2011. Vol. 3(1). P. 107–124. DOI: 10.3390/pharmaceutics3010107.
- 82.Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway / J. Hitomi et al. *Cell*. 2008. Vol. 135(7). P. 1311–1323. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.044.
- 83.In vitro Comparison of Adipogenic Differentiation in Human Adipose-Derived Stem Cells Cultured with Collagen Gel and Platelet-Rich Fibrin / P. Priyadarshini et al. *Indian J. Plast. Surg.* 2021. Vol. 54(3). P. 278–283. DOI: 10.1055/s-0041-1733810.
- 84.Indrayan A., Malhotra K. R. Medical biostatistics. 4th ed. Boca Raton : CRC Press, 2018. 685 p.
- 85.Induction of apoptosis of tumor cells by some potentiated homeopathic drugs: implications on mechanism of action / K. Preethi et al. *Integr. Cancer Ther.* 2012. Vol. 11(2). P. 172–182. DOI: 10.1177/1534735411400310.
- 86.Influence of Excipients on the Structural and Mechanical Properties of Semisolid Dosage Forms / H. Kukhtenko et al. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2017. Vol. 11(3). P. 575–578.
- 87.Investigation of the influence of the extract of the herb of umbellate wintergreen on the structural and functional state of the kidneys of rats / O. Kovregin et al. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 5(51). P. 89–95. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.314121.
- 88.Investigation relationship between antimicrobial, antioxidant activity and biologically active compounds of blackberry (*rubus fruticocusl.*) Fresh fruit liquid extracts / A. Marchenko et al. *Annals of Mechnikov Institute*. 2024. № 4. P. 3–10. DOI: 10.5281/zenodo.14275647.
- 89.Isolation, Culture and Comprehensive Characterization of Biological Properties of Human Urine-Derived Stem Cells / M. Culenova et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22(22). P. 12503. DOI: 10.3390/ijms222212503.

- 90.Jütte R. A review of the use and role of low potencies in homeopathy. *Complement. Ther. Med.* 2005. Vol. 13(4). P. 291–296. DOI: 10.1016/j.ctim.2005.10.003.
- 91.Kovalyova O., Kovalyova O., Burka O., Kovalyova A., Ryzhkova M., Stolbynska O., Sydorin V. (2024). Vykorystannia fitokompozytsii u vidnovlenni funktsional'noho stanu osib seredn'oho viku, khvorykh na ishemichnu khvorobu sertsia, z metoiu pidvyshchennia tolerantnosti do fizychnoho navantazhennia [Phytocomposition use in middle-aged patients with coronary heart disease functional state restoration to increase physical exercise tolerance]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*, 4, 60–71, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-4-60>
- 92.Kovregin O. V., Osolodchenko T. P., Vladymyrova I. M. The Study of the Antibacterial Effect of the Umbellate Wintergreen Extract. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2024, 22 (4). P. 43-47. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.24.324652>
- 93.Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold. Spring. Harb. Protoc.* 2018. Vol. 2018(6). DOI: 10.1101/pdb.prot095505.
- 94.Liquisolid Systems: A Review / A. S. Kulkarni et al. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2010. Vol. 3(1). P. 795–802. DOI: [10.37285/ijpsn.2010.3.1.1](https://doi.org/10.37285/ijpsn.2010.3.1.1).
- 95.Liquisolid Technique: A Review / A. D. Savkare et al. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. Vol. 8(7). P. 2768–2775.
- 96.Luyckx V., Tonelli M., Stanifer J. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull. World Health Organ*. 2018. Vol. 96(4). P. 414–422. DOI: 10.2471/BLT.17.206441.
- 97.Manso T., Lores M., de Miguel T. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics*. 2021. Vol. 11(1). P. 46. DOI: [10.3390/antibiotics11010046](https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046).

98. Measurement of glomerulus diameter and Bowman's space width of renal albino rats / T. Kotyk et al. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2016. Vol. 126. P. 143–153. DOI: 10.1016/j.cmpb.2015.10.023.
99. Mondal S. K. Manual of Histological Techniques. 2nd ed. Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Ltd. New Delhi, 2019. 296 p.
100. Naphthoquinone Derivatives Isolated from Plants: recent Advances in Biological Activity / E. S. Ahmad et al. *Mini Rev. Med. Chem.* 2020. Vol. 20(19). P. 2019–2035. DOI: 10.2174/1389557520666200818212020.
101. Natural Compounds With Antimicrobial and Antiviral Effect and Nanocarriers Used for Their Transportation / D. Stan et al. *Front Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 723233. DOI: 10.3389/fphar.2021.723233.
102. Naumenko A. N., Gorelaya M. V., Babiy S. O. Biochemical composition of urine in rats with developed Guerin's carcinoma and administration of cisplatin. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2017. Vol. 8(1). P. 11–14. DOI: 10.15421/021702.
103. Nephroprotective effects of nebivolol in 2K1C rats through regulation of the kidney ROS-ADMA-NO pathway / Y. Wang et al. *Pharmacol. Rep.* 2018. Vol. 70(5). P. 917–929. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.04.004.
104. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds / M. Gomez Perez et al. *Anal. Biochem.* 2017. Vol. 535. P. 43–46. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.027.
105. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 2020. Vol. 83(3). P. 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
106. Pharmaceutical application of multivariate modelling techniques: a review on the manufacturing of tablets / G. Shi et al. *RSC Adv.* 2021. Vol. 11(14). P. 8323–8345. DOI: 10.1039/d0ra08030f.
107. Phenolic compounds in Plants: biogenesis and functions / L. M. Babenko et al. *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91(3). P. 5–18. DOI: [10.15407/ubj91.03.005](https://doi.org/10.15407/ubj91.03.005).

108. Phenological Variations in the Content of Polyphenols and Triterpenoids in *Epilobium angustifolium* Herb Originating from Ukraine / L. Ivanauskas et al. *Plants*. 2024. Vol. 13(1). P. 120. DOI: [10.3390/plants13010120](https://doi.org/10.3390/plants13010120).
109. Potent inhibition of bacterial neuraminidase activity by pterocarpan isolated from the roots of *Lespedeza bicolor* / H. S. Woo et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 21(20). P. 6100–6103. DOI: [10.1016/j.bmcl.2011.08.046](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.046).
110. Preparation of *Curcuma comosa* tablets using liquisolid techniques: In vitro and in vivo evaluation / N. Jaipakdee et al. *International journal of pharmaceutics*. 2018. Vol. 553(1–2). P. 157–168. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2018.10.031](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.031).
111. Qualitative and Quantitative Analysis of Ukrainian Iris Species: A Fresh Look on Their Antioxidant Content and Biological Activities / O. Mykhailenko et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 4588. DOI: [10.3390/molecules25194588](https://doi.org/10.3390/molecules25194588).
112. Raja S., Ravindranadh K., Keerthi T. A complete profile on *Chimphila umbellata*-traditional uses, pharmacological activities and phytoconstituents. *International Journal of Phytomedicine*. 2014. Vol. 6(4). P. 464–470.
113. Renoprotective effects of the novel prostaglandin EP4 receptor-selective antagonist ASP7657 in 5/6 nephrectomized chronic kidney disease rats / K. Mizukami et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019. Vol. 392(4). P. 451–459. DOI: [10.1007/s00210-018-01600-3](https://doi.org/10.1007/s00210-018-01600-3).
114. Repetto G., Peso A., Zurita J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3(7). P. 1125–1131. DOI: [10.1038/nprot.2008.75](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75).
115. Resveratrol attenuates acute kidney injury by inhibiting death receptor-mediated apoptotic pathways in a cisplatin-induced rat model / Q. Hao et al. *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 14(4). P. 3683–3689. DOI: [10.3892/mmr.2016.5714](https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5714).
116. Reznik, V. V., & Grytsyk, A. R. (2024). Хроматографічне дослідження компонентн складу і вмісту фенольних сполук перестрічу гайового

- (*Melampyrum nemorosum* L.). *Фармацевтичний часопис*, (4), 32–38.
<https://doi.org/10.11603/2312-0967.2024.4.14982>
117. Roush G. C., Sica D. A. Diuretics for Hypertension: A Review and Update. *Am. J. Hypertens.* 2016. Vol. 29. P. 1130–1137. DOI: 10.1093/ajh/hpw030.
 118. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols / V. Katalinic et al. *Food Chemistry*. 2006. Vol. 94(4). P. 550–557. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.004.
 119. Shanaida, M. I., Petryk, O. V., Kernychna, I. Z., Korablova, O. A., & Rakhmetov, D. B. (2022). Порівняльний хроматографічний аналіз фенольних сполук у траві двох видів роду чабер (*Satureja* L.). *Фармацевтичний часопис*, (4), 4–11. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.4.13748>
 120. Shebeko S. K., Chernykh V. V., Zupanets K. O. Nephroprotective Effect of the Herbal Composition BNO 2103 in Rats with Renal Failure. *Sci. Pharm.* 2020. Vol. 88(4). P. 47. DOI: [10.3390/scipharm88040047](https://doi.org/10.3390/scipharm88040047).
 121. Stabilized antioxidative plant extracts formulated by liquisolid technique / S. Kurhajec et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020. Vol. 60(2). P. 102022. DOI: [10.1016/j.jddst.2020.102022](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102022).
 122. Study of phenolic compounds of umbellate wintergreen herb and their influence on biochemical indicators of blood and urine in the rat model of chronic kidney disease / O. Kovregin et al. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 4(50). P. 44–52. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.310744.
 123. Study of the influence of the extract of pipsissewa on cell cultures / O. Kovregin et al. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 3(49). P. 78–85. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.307291.
 124. Technology of processing plant extracts using an aluminometasilicate porous carrier into a solid dosage form / K. Kostelanská et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14(2). P. 248. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020248.

125. Teslenko Yu. V., Teslenko M. M., Katerenchuk I. P. Physical and rehabilitation medicine in Ukraine: basic principles and directions, ways to improve rehabilitation care. *Herald. Probl. Biol. Med.* 2019. Vol. 151(2). P. 58–63.
126. The impact of the *Chimaphilla umbellata* (L.) W.P.C. Barton extract on the immune response in animals / Ch. B. Kusheev et al. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020. Vol. 548. P. 072018. DOI: 10.1088/1755–1315/548/7/072018.
127. Thiazide diuretics are back in CKD: the case of chlorthalidone / R. Minutolo et al. *Clin. Kidney J.* 2022. Vol. 16. P. 41–51. DOI: 10.1093/ckj/sfac198.
128. Zhou Y., Yang J. *Chronic Kidney Disease: Overview*. Springer, 2020. DOI: 10.1007/978–981–32–9131–7_1.
129. Zolotareva O. K., Podorvanov V. V., Dubyna D. V. Polyphenolic compounds of macrophytes and their ecological importance. *Ukr. Bot. J.* 2017. Vol. 74(4). P. 373–384. DOI: 10.15407/ukrbotj74.04.373.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Kovregin O., Prokopiuk V., Lytkin D., Vladymyrova I. Study of the influence of the extract of pipsissewa on cell cultures. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 3(49). P. 78-85. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.307291 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Прокопюк В.Ю. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).
2. Kovregin O., Lytkin D., Mykhailenko O., Ivanauskas L., Yudkevych T., Vladymyrova I., Khodak L., Starikov V. Study of phenolic compounds of umbellate wintergreen herb and their influence on biochemical indicators of blood and urine in the rat model of chronic kidney disease. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 4(50). P. 44-52. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.310744 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні частини фітохімічного дослідження; Л. Іванаускас – участь в аналізі результатів фітохімічної частини дослідження; Литкін Д.В. – допомога в проведенні частини фармакологічного дослідження; Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні частини фармакологічного дослідження; Ходак Л.А. – участь в аналізі результатів фармакологічної частини; Старіков В.І. – участь в аналізі результатів фармакологічної частини).
3. Kovregin O., Laryanovska Y., Yudkevych T., Lytkin D., Lebedinets I., Vladymyrova I. Investigation of the influence of the extract of the herb of umbellate wintergreen on the structural and functional state of the kidneys of rats. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2024. № 5(51). P. 89-95. DOI:

10.15587/2519-4852.2024.314121 (*Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження; Лар'яновська Ю.Б. – допомога в проведенні дослідження з вивчення структурно-функціонального стану нирок та аналізі результатів; Лебединець І.О. – допомога в проведенні дослідження з вивчення структурно-функціонального стану нирок; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів*).

4. Коврегін О. В., Литкін Д. В., Владимірова І. М., Юдкевич Т. К. Скринінгові дослідження протизапальної активності екстрактів із зимоліубки зонтичної трави. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2024. № 3(59). С. 42-46. (*Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Юдкевич Т.К. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Литкін Д.В. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів*).
5. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Вивчення амінокислотного складу трави зимоліубки зонтичної (*Chimaphila umbellata L.*). *Фармацевтичний журнал*. 2024. Т. 79, № 4. С.63-71. DOI: 10.32352/0367-3057.4.24.06 (*Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Л. Іванаускас – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів*).
6. Коврегін О. В., Владимірова І. М., Михайленко О. О., Іванаускас Л. Ідентифікація фенольних сполук зимоліубки зонтичної методом

- високоєфективної тонкошарової хроматографії. *Health&Education*. 2024. № 3. С. 58-63. DOI: 10.32782/health-2024.3.7 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Михайленко О.О. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Л. Іванаускас – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).
7. Kovregin O., Soldatov D., Kukhtenko O., Vladymyrova I. Development of technology for obtaining tablets by double granulation method with Pipsisewa (*Chimaphilla Umbellata*) extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. № 6(52). С. 124–133. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.318519 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Кухтенко О.С. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів; Солдатов Д.П. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).
 8. Коврегін О., Махиня Л., Владимірова І. Мікроскопічні та гістохімічні дослідження трави зимолубки зонтичної (*Chimaphilla umbellata* (L.) W. Barton). *Фітотерапія. Часопис*. 2024. № 4. С. 224–231. DOI: 10.32782/2522-9680-2024-4-224 (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач дослідження, Махиня Л.М. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).
 9. Kovregin O. V., Osolodchenko T. P., Vladymyrova I. M. The Study of the Antibacterial Effect of the Umbellate Wintergreen Extract. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2024, 22 (4). P. 43-47. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.24.324652> (Особистий внесок – збір та аналіз даних, участь у проведенні дослідження, участь у написанні та оформленні статті до друку; Владимірова І.М. – формулювання цілей та задач

дослідження, Осолодченко Т.П. – допомога в проведенні дослідження та аналізі результатів).

10. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична як перспективний вид лікарської рослинної сировини. *Youth Pharmacy Science* : матеріали II Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 7-8 груд. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. С. 61-62.
11. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Зимолюбка зонтична: лікувальні властивості та застосування у медицині. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : ТНМУ, 2022. С. 42.
12. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення мінерального складу зимолюбки зонтичної трави. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали V Міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 23-25 листоп. 2022 р. Харків : НФаУ, 2022. С. 73-74.
13. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Вивчення показників якості зимолюбки зонтичної трави. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали XXIX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів*, м. Харків, 19-21 квіт. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 46-47.
14. Коврегін О. В., Владимірова І. М. Скринінгові дослідження протизапальних властивостей водного екстракту зимолюбки лікарської. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали XXX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів*, м. Харків, 17-19 квіт. 2024 р. Харків : НФаУ, 2024. С. 64-65.

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

1. II Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (Харків, 7-8 грудня 2021 р., форма участі – публікація тез).
2. VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (Тернопіль, 27-28 жовтня 2022 р., форма участі – публікація тез).
3. V Міжнар. наук.-практ. internet-конф. (Харків, 23-25 листопада 2022 р., форма участі – публікація тез).
4. XXIX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів (Харків, 19-21 квітня 2023 р., форма участі – публікація тез).
5. XXX Міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів (Харків, 17-19 квітня 2024 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Івано-
Франківського національного медичного
університету

д.м.с.н., професор Козань Н.М.

2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати з розробки технології отримання таблеток методом подвійної грануляції з екстрактом зимолоубки зонтичної.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), кафедра клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53, аспірант Коврегін О.В.
3. **Джерела інформації:** Kovregin, O., Soldatov, D., Kukhtenko, O., Vladymyrova, I. (2024). Development of technology for obtaining tablets by double granulation method with Pipsissewa (Chimaphila Umbellata) extract. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 6 (52), 124–133. DOI:10.15587/2519-4852.2024.318519
4. **Де впроваджено:** на кафедрі фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань технології отримання таблеток з рослинними екстрактами.
7. **Строки впровадження:** 2024-2025 рр.

Затверджено на засіданні кафедри, протокол № 9 від 25.02.2025 р.

Завідувач кафедри фармацевтичного управління,
технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського
національного медичного університету

д-р фарм. наук, професор А.Р. Грицик

Продовж. дод. Б

«Затверджую»



Проректор закладу вищої освіти з
наукової роботи Тернопільського
національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
доктор біологічних наук, професор
І. М. КЛІЩ «14 02 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** результати дослідження фенольних сполук трави зимоліюбки зонтичної та їх впливу на біохімічні показники крові та сечі на моделі хронічної хвороби нирок у щурів.
- 2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), кафедра клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53, аспірант Коврегін О.В.
- 3. Джерела інформації:** O. Kovregin, D. Lytkin, O. Mykhailenko, L. Ivanauskas, T. Yudkevych, I. Vladymyrova, L. Khodak, V. Starikov. Study of phenolic compounds of umbellate wintergreen herb and their influence on biochemical indicators of blood and urine in the rat model of chronic kidney disease. ScienceRise: Pharmaceutical science. – 2024, № 4 (50). – P. 44-52. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.310744
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
- 5. Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань хімічного складу та фармакологічної дії лікарської рослинної сировини.
- 7. Строки впровадження:** 2024-2025 навчальний рік.

Затверджено на засіданні кафедри протокол № 3 від 13 лютого 2025 року.

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

С.М. Марчишин

Продовж. дод. Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
Інституту проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України
д.мед.н., проф. Ольга Прокопчук
20 лютого 2025 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** результати дослідження оцінки впливу екстракту трави зимолубки зонтичної на клітинну культуру L929.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), кафедра клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 53, аспірант Коврегін О.В.
3. **Джерела інформації:** О. Kovregin, V. Prokopiuk, D. Lytkin, I. Vladymyrova. Study of the influence of the extract of pipsissewa on cell cultures. ScienceRise: Pharmaceutical science. – 2024, № 3 (49). – P. 78-85. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.307291
4. **Де впроваджено:** відділ кріоедокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань впливу засобів рослинного походження на культуру клітин.
7. **Строки впровадження:** 2024-2025 навч. рік.

Затверджено на засіданні відділу. протокол № від 18. 02.2025

Зав. відділу кріоедокринології Інституту проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України,
доктор медичних наук, професор



Лісак

Є.І.Легач

Додаток В

ПРОЄКТ

ЗАТВЕРДЖЕНОНаказ Міністерства охорони
здоров'я України

№ _____

Реєстраційне посвідчення

№ _____

Заявник, країна: **ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна**Виробник, країна: **ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна****МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ****Chimaphilla umbellata herba**
Зимолюбки зонтичної трава

МАРКУВАННЯ

На етикетці має бути зазначена наступна інформація: назва фірми-виробника та її товарний знак, адреса фірми-виробника, найменування продукту, номер специфікації, номер серії, дата виробництва, дата закінчення терміну придатності, вага тари, нетто, загальна вага, умови зберігання, штрих-код.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати «Екстракт зимолюбки зонтичної трави рідкий» в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Заявник
Директор
ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС»

В.Б. Демьохін



Продовж. дод. В

ПРОЄКТ

ЗАТВЕРДЖЕНОНаказ Міністерства охорони
здоров'я України

№ _____

Реєстраційне посвідчення

№ _____

Заявник, країна: **ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна**Виробник, країна: **ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», Україна****МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ****Extractum Chimaphillae umbellatae herbae
extractum liquidum****Зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий**

МАРКУВАННЯ

На етикетці має бути зазначена наступна інформація: назва фірми-виробника та її товарний знак, адреса фірми-виробника, найменування продукту, номер специфікації, номер серії, дата виробництва, дата закінчення терміну придатності, вага тари, нетто, загальна вага, умови зберігання, штрих-код.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати «Екстракт зимолюбки зонтичної трави рідкий» в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Заявник
Директор
ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС»

В.Б. Демьохін



Продовж. дод. Г



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС»

В.Б.Демьохін

січня 2025 р.

АКТ АПРОБАЦІЇ

**проекту методів контролю якості на
зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий**

Комісія у складі: директора з виробництва Швінагірь О.В., директора з якості Циба К.М., професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М., аспіранта кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., провела апробацію проекту методів контролю якості на зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий в умовах контрольної-аналітичної та мікробіологічної лабораторій відділу контролю якості ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Проект методів контролю якості на зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий, який одержано в результаті науково-дослідної роботи, розроблений аспірантом кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В. під керівництвом професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М.

Висновок комісії: методики контролю якості, закладені у проекті МКЯ на зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий, відтворюються на дослідних серіях в умовах контрольної-аналітичної та мікробіологічної лабораторій відділу контролю якості ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Директор з виробництва

О.В. Швінагірь

Директор з якості

К.М. Циба

Професор кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету,
д.фарм.н., проф.

І.М. Владимірова

Аспірант кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету

О.В. Коврегін

Продовж. дод. Г



В.Б.Демьохін

15 червня 2025 р.

АКТ АПРОБАЦІЇ

**проекту методів контролю якості на таблетки із вмістом
зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким**

Комісія у складі: директора з виробництва Швінагірь О.В., директора з якості Циба К.М., професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М., аспіранта кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., провела апробацію проекту методів контролю якості на таблетки із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким в умовах контрольної-аналітичної та мікробіологічної лабораторій відділу контролю якості ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Проект методів контролю якості на таблетки із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким, який одержано в результаті науково-дослідної роботи, розроблений аспірантом кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., під керівництвом професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М.

Висновок комісії: методики контролю якості, закладені у проект МКЯ на таблетки із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким, відтворюються на дослідних серіях в умовах контрольної-аналітичної та мікробіологічної лабораторій відділу контролю якості ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Директор з виробництва

О.В. Швінагірь

Директор з якості

К.М. Циба

Професор кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету,
д.фарм.н., проф.

І.М. Владимірова

Аспірант кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету

О.В. Коврегін

Продовж. дод. Г



Директор ТОВ «ДЗ «ГНЦІС»

В.Б. Демьохін

15 січня 2025 р.

АКТ АПРОБАЦІЇ

**проекту технологічного регламенту на виробництво зимолюбки зонтичної
трави екстракт рідкий**

Комісія у складі: директора з виробництва Швінагірь О.В., директора з якості Циба К.М., професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М., аспіранта кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., провела апробацію проекту технологічного регламенту на зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий в умовах дільниці виробництва фітохімічних препаратів цеху №1 ТОВ «ДЗ «ГНЦІС».

Проект технологічного регламенту на виробництво зимолюбки зонтичної трави екстракту рідкого, який одержано в результаті науково-дослідної роботи, розроблений аспірантом кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., під керівництвом професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М.

Висновок комісії: технологічний процес та контроль критичних стадій, які закладені у проект технологічного регламенту на виробництво зимолюбки зонтичної трави екстракт рідкий, відтворюються на дослідних серіях в умовах дільниці виробництва фітохімічних препаратів цеху №1 ТОВ «ДЗ «ГНЦІС».

Директор з виробництва

О.В. Швінагірь

Директор з якості

К.М. Циба

Професор кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету,
д.фарм.н., проф.

І.М. Владимірова

Аспірант кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету

О.В. Коврегін

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС»



В.Б. Демьохін

25 січня 2025 р.

АКТ АПРОБАЦІЇ

**проекту технологічного регламенту на виробництво таблеток із вмістом
зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким**

Комісія у складі: директора з виробництва Швінагірь О.В., директора з якості Циба К.М., професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М., аспіранта кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., провела апробацію проекту технологічного регламенту на таблетки із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким в умовах дільниці виробництва цеху готових лікарських форм ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Проект технологічного регламенту на виробництво таблеток із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким, який одержано в результаті науково-дослідної роботи, розроблений аспірантом кафедри клінічної фармації Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету Коврегін О.В., під керівництвом професора кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету, д.фарм.н., проф. Владимирової І.М.

Висновок комісії: технологічний процес та контроль критичних стадій, які закладені у проект технологічного регламенту на виробництво таблеток із вмістом зимолоубки зонтичної трави екстрактом рідким, відтворюються на дослідних серіях в умовах дільниці виробництва цеху готових лікарських форм ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС».

Директор з виробництва

О.В. Швінагірь

Директор з якості

К.М. Циба

Професор кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету,
д.фарм.н., проф.

І.М. Владимірова

Аспірант кафедри клінічної фармакології
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету

О.В. Коврегін