

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Власова Інна Костянтинівна**

УДК 615.322:582.912.4:581.192

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Фармакогностичне дослідження сировини та екстрактів журавлини  
великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) для створення нових  
лікарських засобів**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

І. К. Власова

Наукові керівники:

Кухтенко О. С., доктор фармацевтичних наук, професор

Кошовий О. М., доктор фармацевтичних наук, професор

Харків – 2026

## АНОТАЦІЯ

Власова І. К. Фармакогностичне дослідження сировини та екстрактів журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) для створення нових лікарських засобів. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2026.

Дисертаційна робота присвячена системному фармакогностичному дослідженню листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) як перспективної лікарської рослинної сировини, та обґрунтуванню доцільності його використання для одержання екстрактів та їх комплексів з амінокислотами, дослідженню їх фітохімічного складу та фармакологічної активності, розробці підходів до їх стандартизації для створення нових лікарських засобів рослинного походження.

На першому етапі проведено макро- та мікроскопічний аналіз сировини, описано комплекс діагностичних ознак листя і пагонів журавлини великоплодої та журавлини болотної (*Oxycoccus palustris* Pers). Надземні органи представлені здерев'янілими сланкими та висхідними пагонами з почерговим листкорозташуванням і короткими міжвузлями. Листки прості, короткочерешкові, шкірясті, з цільним краєм і перистим жилкуванням; листкова пластинка журавлини болотної є вужчою та характеризується загостреною верхівкою. Листки обох видів мають дорзивентральний тип будови з 1–2-шаровою палісадною та 3–4-шаровою губчастою хлоренхімою. Черешок однопучковий, з добре диференційованими флоемою і ксилемою; у паренхімі виявлено численні друзи кальцію оксалату. Нижня епідерма містить численні продиhi аномоцитного та парацитного типів і кристалоносну обкладинку вздовж жилок; верхня епідерма без продиhив. Стебла характеризуються безпучковою або перехідною будовою осевого циліндра з кільцем механічних елементів і ксилемою з пористими та драбинчастими

судинами. Макро- та мікродіагностичні ознаки встановлено для ідентифікації та оцінки якості сировини журавлини великоплодої.

За даними атомно-емісійного спектрального аналізу в листі, плодах і стеблах журавлини великоплодої ідентифіковано 6 макроелементів (K, Ca, Mg, Si, P, Na) та 9 мікроелементів (Fe, Mn, Al, Zn, Cu, Mo, Sr, Ni, Co) і визначено їх кількісний вміст. Домінуючим елементом у всіх надземних органах є калій, максимальний вміст якого встановлено у плодах (1666 мг/100 г сировини), нижчий – у листі (1170 мг/100 г сировини) та стеблах (730 мг/100 г сировини). Високі концентрації також характерні для кальцію (190–417 мг/100 г сировини), тоді як магній і фосфор накопичуються у середніх кількостях. Листя відзначається підвищеним вмістом заліза та мангану. Вміст потенційно токсичних елементів (Pb, Cd, As, Hg, Co) не перевищував межі визначення, що свідчить про екологічну безпеку дослідженої рослинної сировини.

Уперше встановлено багатокomпонентний фенольний профіль листя журавлини великоплодої, який представлений гідроксикарбоновими та гідроксикоричними кислотами, флаван-3-олами і конденсованими танінами, а також численними флавонолглікозидами, переважно похідними кверцетину та кемпферолу. Якісний тонкошаровий хроматографічний (ТШХ) аналіз екстрактів листя журавлини великоплодої та журавлини болотної підтвердив наявність зон, що відповідають стандартам хлорогенової кислоти, гіперозиду, рутину та кверцетину і засвідчив придатність методики для ідентифікації основних фенольних компонентів.

Спектрофотометричне визначення основних груп біологічно активних речовин засвідчило високий рівень накопичення фенольних сполук у листі журавлини великоплодої порівняно з журавлиною болотною: сума фенольних сполук (у перерахунку на галову кислоту) –  $4,22 \pm 0,07$  % проти  $3,75 \pm 0,05$  %, сума флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) –  $1,28 \pm 0,04$  % проти  $1,11 \pm 0,09$  %, сума гідроксикоричних кислот (у перерахунку на хлорогенову кислоту) –  $3,85 \pm 0,06$  % проти  $3,04 \pm 0,03$  %.

Розроблено технології одержання екстрактів з листя журавлини великоплодої та обґрунтовано вибір методу мацерації і 50 % розчину етанолу як екстрагенту для екстракції фенольних сполук. Експериментально встановлено оптимальні технологічні параметри процесу: співвідношення сировина : екстрагент 1:10 та трикратну екстракцію. На основі цього опрацьовано спосіб одержання сухого екстракту та розроблено підхід до одержання модифікованих екстрактів шляхом додавання амінокислот (валін, аргінін, аланін, гліцин, гістидин, аспарагінова кислота, таурин) у еквімолярній кількості до вмісту фенольних сполук.

Проведено фітохімічний аналіз сполук фенольної природи у одержаних екстрактах. Методом ТШХ ідентифіковано зони, що відповідають хлорогеновій кислоті, гіперозиду та кверцетину. Елементний аналіз сухого екстракту засвідчив домінування калію (1300 мг/100 г сировини) та значний вміст кальцію (345 мг/100 г сировини) і магнію (195 мг/100 г сировини) за відсутності кількісно значущих концентрацій потенційно токсичних елементів. Методом високоефективної рідинної хроматографії з фотодіодним матричним детектором уперше охарактеризовано фенольний профіль і встановлено наявність гідроксикоричних кислот (хлорогенова, неохлорогенова, 4-*O*-кофеїлхінна, *p*-кумарова), флаван-3-олів ((+)-катехін, (-)-епікатехін), проантоціанідинів А1 та А2, антоціанів (ціанідин-3-*O*-галактозид, ціанідин-3-*O*-арабінозид) і флавонольних глікозидів; показано, що амінокислотна модифікація змінює співвідношення компонентів і знижує сумарний показник фенольних сполук (для сухого екстракту – 64196 мкг/г; для модифікованих – 3971–47379 мкг/г). Спектрофотометрично визначено вміст основних груп біологічно активних речовин у сухих екстрактах: у вихідному екстракті сума фенольних сполук становила  $17,16 \pm 0,29$  % ( $19,18 \pm 0,43$  % за Фоліна–Чокальтеу), флавоноїдів –  $4,01 \pm 0,26$  % (у перерахунку на рутин), похідних гідроксикоричних кислот –  $11,54 \pm 0,11$  % (у перерахунку на хлорогенову кислоту), тоді як в екстракті, модифікованому аргініном, ці показники зменшувалися до  $4,94 \pm 0,30$ – $7,59 \pm 0,56$  %,  $2,53 \pm 0,14$  % та  $7,10 \pm 0,07$ – $8,10 \pm 0,37$  % відповідно.

Антимікробну активність екстрактів з листя журавлини великоплодої оцінювали за здатністю пригнічувати ріст стандартних тест-штамів мікроорганізмів різної таксономічної належності. Встановлено, що вони проявляли інгібувальний вплив щодо всіх досліджуваних мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Candida albicans* ATCC 653/885) із формуванням зон затримки росту в межах 14,3–20,3 мм. Найбільшу активність вони проявили проти *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*.

Уперше протизапальну активність екстракту з листя журавлини досліджували *in vitro* на клітинах шкіри людини (кератиноцитах і фібробластах). За результатами аналізу встановлено дозозалежний вплив екстракту на життєздатність клітин із більшою чутливістю кератиноцитів порівняно з фібробластами. За даними імуноферментного аналізу показано, що екстракт знижував секрецію прозапальних цитокінів інтерлейкін-6 та інтерлейкін-8, при цьому характер ефекту залежав від типу клітин і концентрації. Протизапальну активність *in vivo* оцінювали на моделі карагенін-індукованого набряку. Немодифікований екстракт зменшував вираженість ексудації на 18–23 %, тоді як екстракт, модифікований аргініном, забезпечував більш виражений ефект – до 35 % на ранніх етапах розвитку запальної реакції. Максимальна активність обох екстрактів спостерігалася на другій годині після введення флогогену.

Дослідження гострої токсичності показало відсутність летальних випадків і клінічних ознак токсичної дії при внутрішньошлунковому введенні досліджуваних екстрактів. Гепатопротекторну активність оцінювали на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту. Встановлено, що екстракт і його амінокислотні модифікації знижували коефіцієнт маси печінки та нормалізували активність аланінамінотрансферази й аспартатамінотрансферази порівняно з контрольною патологією. За ефективністю корекції зазначених показників композиції екстракту з аргініном і валіном були співставними або перевищували дію препарату порівняння «Силібор». Також відзначалося зменшення рівня

тіобарбітуровоокислот-реактивних речовин у сироватці крові та гомогенаті печінки, найбільш виражене у групах, що отримували амінокислотно модифіковані екстракти, що свідчить про пригнічення процесів ліпопероксидації та реалізацію антиоксидантного механізму гепатопротекторної дії.

Гіпоглікемічну активність екстракту з листя журавлини великоплодої та його модифікації з аргініном досліджували на моделі інсулінорезистентності, індукованої фруктозозбагаченою дієтою. Застосування екстракту з аргініном сприяло зниженню базальної глікемії, покращенню толерантності до глюкози за результатами перорального глюкозотолерантного тесту, зменшенню індексу НОМА-IR підвищенню інсулінової чутливості за даними тесту толерантності до інсуліну порівняно з нелікованою групою з інсулінорезистентністю. За сукупністю показників глікемічного контролю та інсулінової чутливості ефективність екстракту з аргініном була співставною з дією препарату «Метформін-Тева» та перевищувала ефективність фітопрепарату «Арфазетин». Крім того, встановлено часткову нормалізацію показників ліпідного обміну в сироватці крові та печінці.

Розроблено методи стандартизації листя журавлини великоплодої за такими показниками: визначення, зовнішні ознаки (макроскопія), мікроскопія, ідентифікація методом ТШХ, сторонні домішки (не більше 2 %), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), загальна зола (не більше 7 %), кількісне визначення (сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид – не менше 1 %). Методи стандартизації сухого екстракту та екстракту, модифікованого аргініном, включають: опис, розчинність, ідентифікацію методами ТШХ (А і В), втрату в масі під час висушування (не більше 20 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий – не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічну чистоту, кількісне визначення (сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид – не менше 4 % для сухого екстракту і не менше 2 % для модифікованого з аргініном; сума похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту – не менше 10 % для сухого екстракту і не менше 3 % для модифікованого з аргініном). Наукова новизна роботи підтверджена патентами України на винахід (№ 127117) та корисну модель (№ 147975).

Розроблені нові пероральні дозовані форми з екстрактами журавлини великоплодої, які були одержані за допомогою екструзійного 3D-друку. Показано, що перспективною водною гелевою композицією з екстрактами журавлини великоплодої є формуляція, яка складається з екстракту у концентрації 100 мг/мл та еумульгину 150 мг/мл у гелевій платформі на основі 12 % поліетиленоксиду. Надруковані зразки повністю дезінтегрувалися у воді протягом 15 хв. Сучасні 3D-друковані дискові препарати після незначної модифікації можуть бути використані як лікарська форма з негайним вивільненням для перорального застосування екстрактів листя журавлини.

**Ключові слова:** журавлина великоплода, листя, фенольні сполуки, фітохімічне вивчення, технологія, сухий екстракт, амінокислота, модифікація, антимікробна активність, протизапальна активність, антиоксидантна активність, гепатопротекторна активність, гіпоглікемічна активність, екструзійний 3D-друк, пероральні дозовані форми.

#### *Список публікацій здобувача*

1. Мінеральний склад надземних органів журавлини великоплодої / І. К. Власова, О. М. Кошовий, М. А. Комісаренко, А. М. Ковальова, Т. В. Ільїна. *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 1. С. 46–49. DOI: 10.33617/2522-9680-2020-1-46 URL: <https://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/22595> (Scopus, квартал Q4) (Особистий внесок здобувача – проведено інформаційний пошук, пробопідготовку, участь у аналізі та узагальненні результатів дослідження та підготовці статті до друку; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формування висновків; Комісаренко М. А. – допомога в організації експериментальних досліджень; Ковальова А. М. – аналіз результатів; Ільїна Т. В. – формулювання деяких положень, допомога в організації написання висновків).

2. Визначення параметрів екстракції біологічно активних речовин із журавлини листя / І. К. Власова, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, М. А. Комісаренко, Т. В. Ільїна, А. М. Ковальова. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2022. № 2 (39). С. 145–

152. DOI: 10.14739/2409-2932.2022.2.258524 URL: <https://pharmed.zsmu.edu.ua/article/download/258524/258742> (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, пробопідготовку, брала участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – допомога в організації експериментальних досліджень, оформлення результатів; Кухтенко О. С. – формулювання цілей та задач дослідження, формування висновків; Комісаренко М. А. – аналіз результатів дослідження; Ільїна Т. В. – аналіз результатів дослідження; Ковальова А. М. – огляд літературних джерел).

3. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. leaves / I. Vlasova, T. Gontova, L. Grytsyk, G. Zhumashova, G. Sayakova, A. Boshkayeva, M. Shanaida, O. Koshovyi. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352 URL: [https://journals.uran.ua/sr\\_pharm/article/view/260352](https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/260352) (**Scopus, квартал Q3**) (Особистий внесок – виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку; Гонтова Т. М. – виконана частина експериментального дослідження, формування висновків; Грицик Л. М. – оформлення статті; Жумашова Г. Т. – проведено обробку матеріалу; Саякова Г. М. – аналіз літературних джерел; Бошкаєва А. К. – аналіз літературних джерел; Шанайда М. І. – формування висновків; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, аналіз результатів дослідження).

4. Vlasova I. K., Koshovyi O. M. Standardization of dry extracts from large cranberry leaves. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 40–45. DOI: 10.24959/ophcj.22.265845 URL: <https://ophcj.nuph.edu.ua/article/download/265845/262793/615611> (Особистий внесок здобувача – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків).

5. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листя / І. К. Власова, І. В. Боцула, І. В. Кіреєв, О. М. Кошовий. *Вісник фармації*. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13.

DOI: 10.24959/nphj.23.106 URL: <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/30227>

(Особистий внесок – виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку; Боцула І. В. – виконана частина експериментального дослідження; Кіреєв І. В. – аналіз результатів дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків).

6. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi, I. Vlasova, V. Jakstas, G. Vilikickyte, R. Hrytsyk, L. Hrytsyk, A. Raal. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010 URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/10/2010> (Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q1)

(Особистий внесок – виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Jakstas V. – аналіз результатів дослідження; Vilikickyte G. – виконана частина експериментального дослідження; Грицик Л. М. – формування висновків, підготовлення статті до друку; Грицик Р. А. – виконана частина експериментального дослідження; Raal A. – формування висновків, аналіз літературних джерел).

7. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results / A. Raal, M. Kõiva, A. Kuperjanov, K. Vilbaste, I. Vlasova, O. Koshovyi. *Folklore*. 2023. Vol. 89, P. 107–142. DOI:10.7592/FEJF2023.89.cranberries URL:

[https://www.researchgate.net/publication/372821575\\_Multi-Use\\_of\\_Cranberries\\_Vaccinium\\_Spp\\_Heritage\\_and\\_Pharmaceutical\\_Results](https://www.researchgate.net/publication/372821575_Multi-Use_of_Cranberries_Vaccinium_Spp_Heritage_and_Pharmaceutical_Results) (Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q3)

(Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, брала участь у обговоренні та оформленні статті; Raal A. – оформлення статті та аналіз літературних джерел; Kõiva M. – формулювання розділів, допомога в написанні статті; Kuperjanov A. – оформлення статті та аналіз літературних джерел; Vilbaste K. – пошук та аналіз літературних джерел; Кошовий О. М. – оформлення статті та аналіз літературних джерел).

8. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts /

O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica, J. P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528 URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/11/2528> (Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q1) (Особистий внесок – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, написання висновків; Laur Н. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в написанні висновків; Кравченко Г. Б. – виконана частина експериментального дослідження, обговорення результатів; Красільнікова О. А. – виконана частина експериментального дослідження; Granica S. – аналіз результатів дослідження; Piwowarski J. P. – участь у обговоренні результатів; Heinämäki J. – обговорення результатів, аналіз літературних джерел; Raal A. – участь у обговоренні результатів).

9. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікарського засобу з листя журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022. (Особистий внесок – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).

10. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № u 202100821; заявл. 23.06.2021, Бюл. № 25/2021. (Особистий внесок – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).

11. Власова І. К., Кошовий О. М. Дослідження елементного складу журавлини великоплодої. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVII Міжнародної наук.–практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 8–10 квіт. 2020 р. Харків: НФаУ, 2020, С. 30–31.

12. Власова І. К., Кошовий О. М. Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листя журавлини великоплодої. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Івано-Франківськ, 12–13 трав. 2020 р. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 149.

13. Власова І. К., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Кошовий О. М. Перспектива використання сухого екстракту з листя журавлини великоплодої для корекції інсулінорезистентності. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, м. Харків, 18–19 берез. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 71–72.

14. Власова І. К., Кошовий О. М. Кількісне визначення біологічно активних речовин у настоянках з листя журавлини великоплодої. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матеріали наук.-практ. дист. конф., присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, НФаУ, 2021, С. 76.

15. Власова І. К., Боцула І. В., Рааль А., Кіреєв І. В., Кошовий О. М. Фітохімічне та фармакологічне вивчення сухого екстракту з журавлини великоплодої листя. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вер. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 173–174.

16. Власова І., Комісаренко М., Кошовий О., Кіреєв І. Вивчення хімічного складу та діуретичної активності журавлини листя екстракту сухого. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25–26 лист. 2021 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2021, С. 29–30.

17. Власова І. К., Кошовий О. М. Ідентифікація та кількісне визначення основних біологічно активних речовин в екстрактах з листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) та журавлини болотяної

(*Oxycoccus palustris* Pers.). *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 жовт. 2022 р. Тернопіль: ТНМУ, 2022, С. 25–26.

18. Власова І., Кошовий О. Перспектива використання сухих екстрактів зі стебел журавлини. *Запорізький фармацевтичний форум – 2022* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 17–18 лист. 2022 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2022, С. 21.

19. Vlasova I., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A., Koshovyi O. Valine preparation of *Oxycoccus macrocarpus* leaves extract – a promising hepatoprotective agent. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10–11 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 185.

20. Raal A., Vlasova I., Kravchenko G., Koshovyi O. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus*) leaves extract and its modified arginine preparation for the management of insulin resistance. 71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Dublin, 2–5 July, 2023. *Planta Medica*, 2023. Vol. 89 P. 1385–1386. DOI: 10.1055/s-0043-1774149

21. Laur H., Vlasova I., Koshovyi O., Sandler Topelius N., Heinämäki J., Raal A. Phytochemical and pharmacological study of American cranberry leaves extracts and its dosage forms. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023* : abstract book of the international conference, Tartu, Estonia, 12–13 October, 2023. *Eesti Arst 2023*;102 (Lisa 1): 46.

22. Koshovyi O., Vlasova I., Kravchenko G., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A. The American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaves – a promising source for the creation of medicines for prevention and management of metabolic syndrome and liver diseases. *Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences* : abstract book of the international conference, Hanoi, Vietnam, 8–10 November, 2023. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023. P. 233.

## ANNOTATION

*Vlasova I. K.* Pharmacognostic study of raw materials and extracts of large cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) for the development of new medicinal products – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a Doctor of Philosophy degree by specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy» (22 – Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2026.

The dissertation is devoted to a systematic pharmacognostic investigation of the leaves of large cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) as a promising medicinal plant raw material, and to substantiating the feasibility of its use for obtaining extracts and their complexes with amino acids, studying their phytochemical composition and pharmacological activity, and developing approaches to their standardization for the creation of new herbal medicinal products.

At the first stage, macro- and microscopic analyses of the raw material were conducted, and a complex of diagnostic features of the leaves and shoots of large cranberry and bog cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.) was described. The aerial organs are represented by lignified creeping and ascending shoots with alternate phyllotaxy and short internodes. The leaves are simple, short-petiolate, leathery, with entire margins and pinnate venation; the leaf blade of bog cranberry is narrower and characterized by an acute apex. The leaves of both species have a dorsiventral type of structure with 1–2 layers of palisade and 3–4 layers of spongy chlorenchyma. The petiole is single-bundled, with well-differentiated phloem and xylem; numerous calcium oxalate druses were detected in the parenchyma. The lower epidermis contains numerous stomata of the anomocytic and paracytic types and a crystal-bearing sheath along the veins; the upper epidermis lacks stomata. The stems are characterized by a non-bundled or transitional structure of the axial cylinder with a ring of mechanical elements and xylem containing porous and scalariform vessels. Macro- and microdiagnostic features were established for the identification and quality assessment of large cranberry raw material.

According to atomic emission spectral analysis, 6 macroelements (K, Ca, Mg, Si, P, Na) and 9 microelements (Fe, Mn, Al, Zn, Cu, Mo, Sr, Ni, Co) were identified in the leaves, fruits, and stems of large cranberry, and their quantitative content was determined. Potassium is the dominant element in all aerial organs, with the highest content established in the fruits (1666 mg/100 g of raw material), lower in the leaves (1170 mg/100 g of raw material), and in the stems (730 mg/100 g of raw material). High concentrations are also characteristic of calcium (190–417 mg/100 g of raw material), whereas magnesium and phosphorus accumulate in moderate amounts. The leaves are characterized by an increased content of iron and manganese. The content of potentially toxic elements (Pb, Cd, As, Hg, Co) did not exceed the limits of detection, which indicates the ecological safety of the investigated plant raw material.

For the first time, a multicomponent phenolic profile of large cranberry leaves was established, represented by hydroxycarboxylic and hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and condensed tannins, as well as numerous flavonol glycosides, predominantly quercetin and kaempferol derivatives. Qualitative thin-layer chromatographic (TLC) analysis of extracts from large cranberry and bog cranberry leaves confirmed the presence of zones corresponding to the standards of chlorogenic acid, hyperoside, rutin, and quercetin and demonstrated the suitability of the method for the identification of the main phenolic components.

Spectrophotometric determination of the main groups of biologically active substances demonstrated a high level of accumulation of phenolic compounds in large cranberry leaves compared with bog cranberry: total phenolic compounds (calculated as gallic acid) –  $4,22 \pm 0,07$  % versus  $3,75 \pm 0,05$  %, total flavonoids (calculated as hyperoside) –  $1,28 \pm 0,04$  % versus  $1,11 \pm 0,09$  %, total hydroxycinnamic acids (calculated as chlorogenic acid) –  $3,85 \pm 0,06$  % versus  $3,04 \pm 0,03$  %.

Technologies for obtaining extracts from large cranberry leaves were developed, and the choice of the maceration method and 50 % ethanol solution as the extractant for phenolic compound extraction was substantiated. The optimal technological parameters of the process were experimentally established: raw material to extractant ratio of 1:10 and triple extraction. On this basis, a method for obtaining a dry extract was elaborated,

and an approach to obtaining modified extracts by adding amino acids (valine, arginine, alanine, glycine, histidine, aspartic acid, taurine) in an equimolar amount relative to the content of phenolic compounds was developed.

A phytochemical analysis of phenolic compounds in the obtained extracts was carried out. By TLC, zones corresponding to chlorogenic acid, hyperoside, and quercetin were identified. Elemental analysis of the dry extract demonstrated the predominance of potassium (1300 mg/100 g raw material) and a significant content of calcium (345 mg/100 g raw material) and magnesium (195 mg/100 g raw material) in the absence of quantitatively significant concentrations of potentially toxic elements. By high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector, the phenolic profile was characterized for the first time, and the presence of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, neochlorogenic, 4-*O*-caffeoylquinic, *p*-coumaric), flavan-3-ols ((+)-catechin, (-)-epicatechin), proanthocyanidins A1 and A2, anthocyanins (cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside), and flavonol glycosides was established; it was shown that amino acid modification alters the component ratio and reduces the total phenolic content (for the dry extract – 64196 µg/g; for the modified extracts – 3971–47379 µg/g). Spectrophotometric determination of the main groups of biologically active substances in the dry extracts showed that in the initial extract the total phenolic compounds amounted to  $17,16 \pm 0,29$  % ( $19,18 \pm 0,43$  % by the Folin–Ciocalteu method), flavonoids –  $4,01 \pm 0,26$  % (calculated as rutin), hydroxycinnamic acid derivatives –  $11,54 \pm 0,11$  % (calculated as chlorogenic acid), whereas in the extract modified with arginine these values decreased to  $4,94 \pm 0,30$ – $7,59 \pm 0,56$  %,  $2,53 \pm 0,14$  %, and  $7,10 \pm 0,07$ – $8,10 \pm 0,37$  %, respectively.

The antimicrobial activity of extracts from large cranberry leaves was evaluated by their ability to inhibit the growth of standard test strains of microorganisms of different taxonomic affiliations. It was established that they exhibited an inhibitory effect against all studied microorganisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Candida albicans* ATCC 653/885), with the formation

of growth inhibition zones ranging from 14,3 to 20,3 mm. The highest activity was observed against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

For the first time, the anti-inflammatory activity of the large cranberry leaf extract was investigated *in vitro* on human skin cells (keratinocytes and fibroblasts). The analysis demonstrated a dose-dependent effect of the extract on cell viability, with greater sensitivity of keratinocytes compared to fibroblasts. According to enzyme-linked immunosorbent assay data, the extract reduced the secretion of the pro-inflammatory cytokines interleukin-6 and interleukin-8, with the nature of the effect depending on the cell type and concentration. Anti-inflammatory activity *in vivo* was evaluated using a carrageenan-induced edema model. The non-modified extract reduced the severity of exudation by 18–23 %, whereas the extract modified with arginine provided a more pronounced effect, up to 35 % at the early stages of inflammatory response development. The maximum activity of both extracts was observed at the second hour after phlogogen administration.

The acute toxicity study showed no lethal cases and no clinical signs of toxic effects following intragastric administration of the investigated extracts. Hepatoprotective activity was evaluated in a model of acute carbon tetrachloride-induced hepatitis. It was established that the extract and its amino acid modifications reduced the liver weight coefficient and normalized the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase compared to the pathology control. In terms of correction efficiency of these parameters, the compositions of the extract with arginine and valine were comparable to or exceeded the effect of the reference drug «Silibor». A decrease in the level of thiobarbituric acid reactive substances in blood serum and liver homogenate was also observed, most pronounced in the groups receiving amino acid-modified extracts, which indicates inhibition of lipid peroxidation processes and the implementation of an antioxidant mechanism of hepatoprotective action.

The hypoglycemic activity of the large cranberry leaf extract and its modification with arginine was investigated in a model of insulin resistance induced by a fructose-enriched diet. Administration of the extract with arginine contributed to a reduction in basal glycemia, improvement of glucose tolerance according to the results of the oral

glucose tolerance test, a decrease in the HOMA-IR index, and an increase in insulin sensitivity according to the insulin tolerance test compared with the untreated insulin-resistant group. According to the combined indicators of glycemic control and insulin sensitivity, the efficacy of the extract with arginine was comparable to that of the drug «Metformin-Teva» and exceeded the efficacy of the herbal medicinal product «Arfazetin». In addition, partial normalization of lipid metabolism parameters in blood serum and liver was established.

Methods for the standardization of large cranberry leaves were developed according to the following parameters: identification, external characteristics (macroscopy), microscopy, identification by TLC, foreign matter (not more than 2 %), loss on drying (not more than 10 %), total ash (not more than 7 %), quantitative determination (total flavonoids calculated as hyperoside – not less than 1 %). Standardization methods for the dry extract and the arginine-modified extract include: description, solubility, identification by TLC methods (A and B), loss on drying (not more than 20 %), residual organic solvents (ethyl alcohol – not more than 1,0 %), heavy metals (not more than 100 ppm), microbiological purity, quantitative determination (total flavonoids calculated as hyperoside – not less than 4 % for the dry extract and not less than 2 % for the arginine-modified extract; total hydroxycinnamic acid derivatives calculated as chlorogenic acid – not less than 10 % for the dry extract and not less than 3 % for the arginine-modified extract). The scientific novelty of the work is confirmed by Ukrainian patents for invention (№ 127117) and utility model (№ 147975).

New oral dosage forms with large cranberry extracts were developed using extrusion-based 3D printing. It was shown that a promising aqueous gel composition with large cranberry extracts is a formulation consisting of the extract at a concentration of 100 mg/mL and eumulgin 150 mg/mL in a gel platform based on 12 % polyethylene oxide. The printed samples completely disintegrated in water within 15 min. Modern 3D-printed disc-shaped preparations, after minor modification, may be used as an immediate-release dosage form for oral administration of large cranberry leaf extracts.

**Key words:** large cranberry, leaves, phenolic compounds, phytochemical investigation, technology, dry extract, amino acid, modification, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, hepatoprotective activity, hypoglycemic activity, extrusion-based 3D printing, oral dosage forms.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
<b>РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ АКТИВНОСТІ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ (Огляд літератури) .....</b>	<b>31</b>
1.1 Ботанічна характеристика журавлини великоплодої.....	31
1.2 Ареал зростання рослини, заготівля сировини .....	36
1.3 Хімічний склад журавлини великоплодої .....	37
1.4 Фармакологічна активність біологічно активних речовин журавлини великоплодої.....	42
1.4.1 Антиоксидантна активність .....	42
1.4.2 Протизапальна активність.....	43
1.4.3 Гіполіпідемічна та антидіабетична активність .....	44
1.4.4 Антимікробна активність .....	45
1.4.5 Гепатопротекторна активність .....	46
1.4.6 Антигіпертензивна та кардіопротекторна активність.....	46
1.4.7 Протипухлинна активність .....	47
1.5 Фармакопейний статус і напрями застосування журавлини великоплодої.....	48
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІЛИ ТА МЕТОДИ .....</b>	<b>51</b>
2.1 Заготівля сировини .....	51
2.2 Методика макро- та мікроскопічного аналізу сировини .....	52
2.3 Методика визначення елементного складу надземних органів журавлини великоплодої та екстракту з її листя.....	53
2.4 Методика визначення фенольних сполук методом високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням .....	54
2.5 Методика якісного тонкошарового хроматографічного аналізу фенольних сполук листя журавлини великоплодої та журавлини болотної.....	55
2.6 Методика якісного тонкошарового хроматографічного аналізу фенольних сполук екстракту листя журавлини великоплодої.....	56
2.7 Методика кількісного визначення суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту .....	57
2.8 Методика кількісного визначення суми фенольних сполук методом Фоліна-Чокальтеу.....	59
2.9 Методика кількісного визначення суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) .....	60
2.10 Методика кількісного визначення суми флавоноїдів (у перерахунку на рутин).....	62
2.11 Методика кількісного визначення суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту .....	63

2.12	Методика кількісного визначення суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту за питомим показником поглинання.....	65
2.13	Методика аналізу фенольних сполук методом вискоефективної рідинної хроматографії з фотодіодним матричним детектором.....	66
2.14	Формування гелевих систем для напівтвердого екструзійного тривимірного друку зразків з екстрактами листя журавлини великоплодої.....	67
2.15	Методика дослідження антимікробної активності екстрактів .....	68
2.16	Методика визначення протизапальної активності екстракту на клітинних моделях шкіри <i>in vitro</i> .....	70
2.17	Методика дослідження протизапальної активності на моделі карагенін-індукованого набряку.....	73
2.19	Методика дослідження гепатопротекторної активності.....	75
2.20	Методика дослідження гіпоглікемічної активності .....	77
2.21	Методика визначення мікробіологічної чистоти екстрактів.....	80
РОЗДІЛ 3	<b>ФАРМАКОГНОСТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЛИСТЯ ТА ПАГОНІВ</b>	
	<b>ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ ТА БОЛОТНОЇ .....</b>	<b>81</b>
3.1	Макроскопічний аналіз сировини .....	81
3.2	Мікроскопічний аналіз сировини .....	85
3.3	Хімічний аналіз листя журавлини великоплодої та болотної.....	95
3.3.1	Визначення елементного складу надземних органів журавлини великоплодої.....	95
3.3.2	Визначення фенольних сполук методом вискоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням .....	98
3.3.3	Якісний тонкошаровий хроматографічний аналіз фенольних сполук листя журавлини великоплодої та журавлини болотної.....	102
3.3.4	Визначення кількісного вмісту груп біологічно активних речовин спектрофотометричним методом .....	104
	Висновки до розділу 3 .....	106
РОЗДІЛ 4	<b>ФІТОХІМІЧНЕ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЕКСТРАКТІВ З</b>	
	<b>ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ.....</b>	<b>108</b>
4.1	Розробка способів одержання екстрактів .....	108
4.1.1	Вибір екстрагенту та параметрів екстракції фенольних сполук .	108
4.1.2	Спосіб отримання сухого екстракту .....	112
4.1.3	Розробка способу одержання екстрактів журавлини з додаванням амінокислот.....	113
4.2	Якісний тонкошарово хроматографічний аналіз фенольних сполук екстракту листя журавлини великоплодої .....	116
4.3	Елементний аналіз екстракту.....	117
4.4	Аналіз фенольних сполук методом вискоефективної рідинної хроматографії з фотодіодним матричним детектором.....	119

4.5	Визначення кількісного вмісту груп біологічно активних речовин спектрофотометричними методами .....	124
4.6	Фармакологічне дослідження біологічної активності екстрактів з листя журавлини великоплодої .....	126
4.6.1	Антимікробна активність .....	126
4.6.2	Протизапальна активність на клітинних моделях шкіри <i>in vitro</i> .....	128
4.6.3	Протизапальна активність на моделі карагенін-індукованого набряку .....	133
4.6.4	Дослідження гострої токсичності.....	135
4.6.5	Гепатопротекторна активність .....	136
4.6.6	Гіпоглікемічна активність.....	139
4.7	Формування гелевих систем з екстрактами листя журавлини великоплодої для напівтвердого екструзійного тривимірного друку зразків .....	147
	Висновки до розділу 4 .....	149
<b>РОЗДІЛ 5 СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ ТА ЕКСТРАКТІВ НА ЇХ ОСНОВІ.....</b>		<b>154</b>
5.1	Розробка методів стандартизації листя журавлини великоплодої .....	154
5.2	Розробка методів стандартизації сухого екстракту з листя журавлини великоплодої та модифікованого екстракту з аргініном .....	159
	Висновки до розділу 5 .....	166
<b>ВИСНОВКИ.....</b>		<b>168</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>		<b>171</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>		<b>190</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

- АлАТ – аланінамінотрансфераза;
- АсАТ – аспартатамінотрансфераза;
- БАР – біологічно активні речовини;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ВЕРХ-ДАД-МС – високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням;
- ВЕРХ-ФДМ – високоефективна рідинна хроматографія з фотодіодним матричним детектором;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДФУ – Державна фармакопея України;
- ІЛ-6 – інтерлейкін-6;
- ІЛ-8 – інтерлейкін-8;
- ІТТ – тест толерантності до інсуліну;
- ІФА – імуноферментний аналіз;
- КМП – коефіцієнт маси печінки;
- ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності;
- ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності;
- ОГТТ – пероральний глюкозотолерантний тест;
- ТБК-реактанти – тіобарбітуровокислот-реактивні речовини;
- ТШХ – тонкошарова хроматографія;
- УФ-спектр – ультрафіолетовий спектр;
- АВТС – тест з використанням катіон-радикалу 2,2'-азино-біс (3- етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти);
- СОХ-2 – циклооксигіназа-2;
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium;
- FRAP – метод визначення відновлювальної антиоксидантної здатності за іонами Fe<sup>3+</sup>;

- ICP-OES – оптично-емісійна спектрометрія з індуктивно зв’язаною плазмою;
- IFN- $\alpha$  – інтерферон  $\alpha$ ;
- JAK–STAT – янус-кіназа – перетворювач сигналу та активатор транскрипції;
- MAPK – мітоген-активовані протеїнкінази;
- NF- $\kappa$ B – ядерний фактор каппа B;
- PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа;
- SRB – сульфородамін B;
- SSE-3D-друк – екструзійний тривимірний друк напівтвердих матеріалів;
- TNF- $\alpha$  – фактор некрозу пухлини-альфа;
- VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту.

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

На сучасному етапі розвитку фармацевтичної науки та практики зростає інтерес до лікарських засобів і фітосубстанцій природного походження, що зумовлено необхідністю підвищення безпеки фармакотерапії, профілактики хронічних неінфекційних захворювань та корекції метаболічних порушень. Особливу увагу приділяють лікарській рослинній сировині, багатій на фенольні сполуки, які виявляють антиоксидантну, протизапальну, гіпоглікемічну та гепатопротекторну активність. Порушення окисно-відновного гомеостазу, хронічне запалення та інсулінорезистентність є ключовими патогенетичними ланками розвитку метаболічного синдрому, цукрового діабету II типу та захворювань печінки, що обумовлює актуальність пошуку нових рослинних джерел біологічно активних речовин для створення ефективних і безпечних лікарських засобів.

Журавлина великоплода (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) родини Ericaceae є перспективною культурою, яка широко культивується у країнах Північної Америки та Європи та має достатню сировинну базу для фармацевтичного використання. В Україні журавлина великоплода набуває все більшого поширення як ягідна культура, однак фармацевтична переробка цієї рослини обмежується переважно використанням плодів у складі функціональних продуктів, тоді як інші морфологічні частини, зокрема листя, залишаються недостатньо дослідженими та не використовуються у вітчизняній фармацевтичній промисловості.

За даними наукової літератури, листя журавлини великоплодої є цінним джерелом фенольних сполук, зокрема похідних гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, проантоціанідинів та інших поліфенолів, які потенційно зумовлюють широкий спектр фармакологічної дії. Водночас більшість досліджень зосереджена на плодах журавлини, тоді як фітохімічний склад листя, його фармакологічні властивості, а також можливість стандартизації та створення на його основі

фітосубстанцій залишаються недостатньо вивченими. Відсутність у ДФУ монографії на листя журавлини великоплодої та стандартизованих вітчизняних екстрактів на його основі свідчить про недостатню розробленість зазначеного напрямку у вітчизняній фармацевтичній науці та практиці.

Актуальність дослідження також зумовлена зростаючим попитом на фітопрепарати та дієтичні добавки для профілактики і корекції метаболічних порушень. Аналіз фармацевтичного ринку України показує, що засоби рослинного походження для корекції інсулінорезистентності, порушень ліпідного обміну та функціонального стану печінки представлені переважно імпортною продукцією або комплексними засобами без належної стандартизації за вмістом біологічно активних речовин. За відсутності обов'язкових вимог до контролю якості функціональних продуктів особливого значення набуває розробка науково обґрунтованих підходів до стандартизації лікарської рослинної сировини та екстрактів відповідно до вимог Державної фармакопеї України.

У зв'язку з вищезазначеним, комплексне фармакогностичне та фармакологічне дослідження листя журавлини великоплодої з обґрунтуванням можливості його використання як лікарської рослинної сировини, розробкою методів стандартизації та оцінкою біологічної активності екстрактів є актуальним і своєчасним науковим завданням, що має важливе теоретичне та практичне значення для розвитку вітчизняної фармацевтичної науки та створення нових лікарських засобів природного походження.

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» Міністерства охорони здоров'я та Національної академії медичних наук України і є фрагментом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946) та «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (№ державної реєстрації 0114U000945), а також теми МОЗ

КПКВК 2301020 «Сучасні підходи до створення нових лікарських засобів для корекції метаболічного синдрому» (2020–2022 рр., № державної реєстрації 0120U102486).

### **Мета і завдання дослідження**

Метою дисертаційної роботи є комплексне фармакогностичне та фармакологічне дослідження листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh), одержання екстрактів на його основі, вивчення їх хімічного складу, біологічної активності, безпечності та розробка підходів до стандартизації для створення перспективних фітосубстанцій та 3D друкованих дозованих лікарських форм для фармацевтичного застосування.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- провести аналіз літературних джерел щодо ботанічної характеристики, хімічного складу та фармакологічних властивостей журавлини великоплодої;
- здійснити фармакогностичне дослідження листя журавлини великоплодої з установленням діагностичних макро- та мікроскопічних ознак;
- дослідити якісний і кількісний склад основних груп біологічно активних речовин листя журавлини великоплодої та екстрактів на їх основі;
- одержати сухі екстракти з листя журавлини великоплодої та екстракти, модифіковані амінокислотами;
- вивчити фармакологічну активність і безпечність одержаних екстрактів;
- розробити підходи до стандартизації рослинної сировини та екстрактів на її основі;
- розробити склад гелю з екстрактами журавлини великоплодої, який придатний для екструзійного 3D друку дозованих лікарських форм.

*Об'єкт дослідження* – фармакогностичне дослідження листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) та екстракти, одержані на його основі.

*Предмет дослідження* – макро- та мікроскопічні ознаки сировини, хімічний склад, фармакологічна активність, безпечність і параметри стандартизації листя журавлини великоплодої та його екстрактів.

### **Методи дослідження**

У роботі використано комплекс сучасних фармакогностичних, фармакологічних методів дослідження. Морфологічні ознаки досліджували за допомогою мікроскопічного аналізу та вимірних засобів. Ідентифікацію та кількісне визначення БАР проводили з використанням хроматографічних (ТШХ, ВЕРХ-ДАД-МС, ВЕРХ-ФДМ) та спектрофотометричних методів. Фармакологічну активність вивчали на моделях *in vitro* та *in vivo*. Статистичну обробку результатів здійснювали відповідно до вимог Державної фармакопеї України. Обробку результатів експериментальних досліджень здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 16.0 та GraphPad Prism 8.0.1.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Уперше проведено комплексне фармакогностичне, зокрема фітохімічне, дослідження листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) з метою наукового обґрунтування можливості його використання як лікарської рослинної сировини. Встановлено морфологічні та анатомічні ознаки листя журавлини великоплодої, які можуть бути використані для ідентифікації та контролю якості сировини. Проведено порівняльне дослідження фенольного комплексу листя журавлини великоплодої та журавлини болотної, за результатами якого встановлено вищий вміст суми фенольних сполук, флавоноїдів і похідних гідроксикоричних кислот у листі журавлини великоплодої.

Уперше здійснено детальне фітохімічне вивчення фенольних сполук листя журавлини великоплодої з використанням методів ТШХ, спектрофотометрії та ВЕРХ. Ідентифіковано похідні гідроксикоричних кислот (хлорогенову, неохлорогенову, 4-*O*-кафеоїлхінну, *p*-кумарову), флаван-3-оли ((+)-катехін, (-)-епікатехін), проантоціанідини А-типу, антоціани та флавонольні глікозиди. Установлено кількісний вміст основних груп біологічно активних речовин фенольної природи.

Одержано сухий стандартизований екстракт з листя журавлини великоплодої та уперше сухі екстракти, модифіковані амінокислотами. Визначено їх якісний склад і кількісний вміст фенольних сполук, флавоноїдів і похідних гідроксикоричних кислот. Уперше проведено порівняльне фітохімічне дослідження немодифікованого та модифікованих екстрактів, у результаті якого підтверджено зміну кількісного співвідношення окремих фенольних компонентів у процесі амінокислотної модифікації.

Уперше розроблено та досліджено 3D-друковану лікарську форму з сухим екстрактом листя журавлини великоплодої на основі полімерної основи – поліетиленоксиду. Обґрунтовано склад гелю для екструзійного 3D друку, визначено реологічні та технологічні параметри, що забезпечують можливість формування 3D-друкованих зразків з відтворюваними характеристиками та контрольованими показниками якості.

Уперше встановлено, що сухі екстракти з листя журавлини великоплодої виявляють протизапальну активність *in vitro* та *in vivo*. Уперше доведено гепатопротекторні властивості екстрактів, що проявляються нормалізацією біохімічних показників функціонального стану печінки в умовах експериментального ураження. Уперше встановлено гіпоглікемічну та гіполіпідемічну активність сухих екстрактів з листя журавлини великоплодої в умовах експериментально індукованих метаболічних порушень.

Наукова новизна роботи підтверджена патентами України на винахід (№ 127117) та корисну модель (№ 147975), які патентують способи одержання сухого екстракту з листя журавлини великоплодої, його модифікації аргініном для корекції інсулінорезистентних станів.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Результати проведеного комплексного фармакогностичного та фармакологічного дослідження листя журавлини великоплодої можуть бути використані при розробці нормативної документації на лікарську рослинну сировину та екстракти на її основі, а також при створенні перспективних фітосубстанцій із протизапальною, гепатопротекторною та гіпоглікемічною

активністю; уперше розроблено методи стандартизації листя журавлини великоплодої та сухого екстракту на його основі. Обґрунтовано перелік показників якості, методи ідентифікації та кількісного визначення основних груп біологічно активних речовин, встановлено нормативні межі вмісту суми фенольних сполук, флавоноїдів і похідних гідроксикоричних кислот. Розроблено параметри стандартизації, придатні для використання у проєктах методик контролю якості лікарської рослинної сировини та фітосубстанції. Розроблені методи стандартизації листя журавлини великоплодої та сухих екстрактів підтверджують можливість їх практичного застосування для контролю якості, а результати досліджень гелевих систем з екстрактом можуть бути використані у подальших науково-дослідних роботах, спрямованих на розробку 3D-друкованих лікарських форм і моделей лікарських форм.

### **Особистий внесок здобувача**

Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Здобувачем особисто здійснено інформаційно-патентний пошук, проаналізовано, систематизовано та узагальнено дані вітчизняних і зарубіжних літературних джерел за темою дисертації. Автором виконано значну частину експериментальних досліджень, зокрема пробопідготовку, фітохімічні, фармакогностичні та фармакологічні дослідження об'єктів, проведено статистичну обробку й узагальнення одержаних результатів, написано всі розділи дисертаційної роботи та сформульовано висновки.

Наукові праці за темою дисертації опубліковані у співавторстві з Боцулою І. В., Бошкаєвою А., Брюхановою Т. О., Вілікіцкіте Г., Гонтовою Т. М., Границею С., Грициком Л. М., Грициком Р. І., Димовою Г., Жумашовою Г. Т., Загайком А. Л., Ільїною Т. В., Кіреєвим І. В., Комісаренком М. А., Ковальовою А. М., Кошовим О. М., Красільніковою О. А., Кравченко Г. Б., Кухтенком О. С., Лаур Н., Півоварським Я. П., Раалем А., Саяковою Г., Сербіним А. Г., Хейнемякі Ю., Хваном Цон-Лонг, Ченом Мен-Хуа, Шанайдою М., Якштасом В.

Співавторами наукових праць є наукові керівники та науковці, спільно з якими проведені дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать фактичний матеріал та основний творчий доробок.

### **Апробація матеріалів дисертації**

Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: XXVII Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (Харків, 8–10 квітня 2020 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (Івано-Франківськ, 12–13 травня 2020 р.); XXVIII Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development», присвяченій 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка (Харків, 18–19 березня 2021 р.); науково-практичній дистанційній конференції «Сучасні аспекти створення лікарських засобів», присвяченій 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ (Харків, 16 квітня 2021 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету «Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи» (Харків, 10 вересня 2021 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум – 2021» (Запоріжжя, 25–26 листопада 2021 р.); VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 27–28 жовтня 2022 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум – 2022» (Запоріжжя, 17–18 листопада 2022 р.); X Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології», присвяченій 60-річчю з дня народження проф. Є. В. Гладуха (Харків, 10–11 травня 2023 р.); Міжнародному конгресі та щорічній зустрічі Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (Дублін, Ірландія, 2–5 липня 2023 р.); Міжнародній науковій конференції «Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023»

(Тарту, Естонія, 12–13 жовтня 2023 р.); Міжнародній науковій конференції «Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences» (Ханой, В'єтнам, 8–10 листопада 2023 р.).

### **Обсяг та структура дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 207 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 158 машинописних сторінок. Робота проілюстрована 16 таблицями та 31 рисунком. Список використаних джерел містить 164 найменування, з них 24 кирилицею та 140 латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ АКТИВНОСТІ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ (Огляд літератури)

Журавлина належить до роду *Vaccinium* L. родини Ericaceae, представники якого є поширеними ягідними та лікарськими рослинами помірною кліматичного поясу [1]. У флорі Європи природно зростає журавлина болотна – *Oxycoccus palustris* Pers. (синонім *Vaccinium oxycoccus* L.), яка здавна використовується у народній медицині та харчуванні [2]. Поряд із нею важливе господарське й фармакологічне значення має журавлина великоплода, або американська журавлина – *Oxycoccus macrocarpos* (Aiton) Pursh (синонім *Vaccinium macrocarpon* Aiton), що походить з Північної Америки, та нині широко культивується як ягідна культура, плоди якої застосовуються у виробництві функціональних продуктів [3, 4].

Зростаючий інтерес до журавлини великоплодої зумовлений її багатим хімічним складом та широким спектром біологічної активності [5–8]. У цьому розділі узагальнено та проаналізовано літературні дані щодо ботанічної характеристики журавлини великоплодої, особливостей її хімічного складу та основних фармакологічних активностей, що є підґрунтям для подальшого фармакогностичного дослідження вегетативних органів рослини.

#### 1.1 Ботанічна характеристика журавлини великоплодої

Журавлина великоплода (*Oxycoccus macrocarpos* (Aiton) Pursh) є вічнозеленим сланким напівчагарником із повзучими або висхідними пагонами, висота яких зазвичай становить від 5 до 20 см. Рослина формує добре розвинену кореневищну систему, що забезпечує вегетативне розмноження та закріплення на вологих субстратах (рис. 1.1) [9].



Рис. 1.1 Журавлина великоплода (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh; *Vaccinium macrocarpon* Aiton [9])

Стебла тонкі, гнучкі, голі або з незначним опушенням, здатні вкорінюватися у вузлах при контакті з ґрунтом. Листки прості, чергові, майже сидячі. Листкова пластинка вузькоеліптичної або еліптичної форми, рідше видовжено-овальна, завдовжки переважно 7–10 мм (інколи до 18 мм) і завширшки 3–4 мм. Верхня поверхня листка зелена, нижня – сизувата; край цілісний, злегка загорнутий донизу (рис. 1.1, 1.2) [9, 10].



Рис. 1.2 Морфологічні особливості пагона журавлини великоплодої з квіткою та листками (загальний вигляд) [9]

Квітки розміщуються поодинокі в пазухах листків на пагонах поточного року. Квітконіжки довгі, зігнуті, довжиною до 2–3 см, з характерним зчленуванням біля основи квітки (рис. 1.1, 1.2). Приквітнички у кількості двох, дрібні, зеленувато-білі. Квітка двостатева, правильна, з добре розвиненим нектароносним диском, що оточує стовпчик. Чашечка чотирилопатева, з короткими лопатями. Віночок білий або рожевий, чашоподібний, з чотирма довгими лопатями, які під час цвітіння різко відгинаються назад. Тичинок вісім; пиляки відкриваються верхівковими порами. Зав'язь нижня, стовпчик одиночний, приймочка головчастої форми [9, 10].

Плід – багатонасінна ягода кулястої форми, діаметром від 9 до 20 мм, чотиригнізда, з гладкою поверхнею (рис. 1.1). Забарвлення плодів варіює від яскраво-червоного до темно-бордового, іноді майже чорного. Насіння тверде, яйцеподібне або еліптичне, завдовжки 1–2,7 мм, жовтувато-оранжевого або червонуватого кольору, з дрібно зморшкуватою або штрихуватою поверхнею [11]. Каріологічно вид характеризується гаплоїдним числом хромосом  $n = 12$  [9].

На поперечному зрізі плоду чітко диференціюються мезокарп і ендокарп світлого або рожево-червоного забарвлення. Мезокарп характеризується наявністю добре розвинених міжклітинників повітряного типу, що забезпечує низьку щільність і плавучість ягід. Плід є чотиригніздим; у кожному гнізді зазвичай формується від однієї до п'яти насінин. Насіння вузькоюйцеподібне або еліптичне, з гострою верхівкою, вкрите блискучою оболонкою червонуватого або жовтувато-оранжевого кольору з поздовжніми складками. Ендосперм добре розвинений, непрозорий, білого кольору (рис. 1.3) [9, 12].

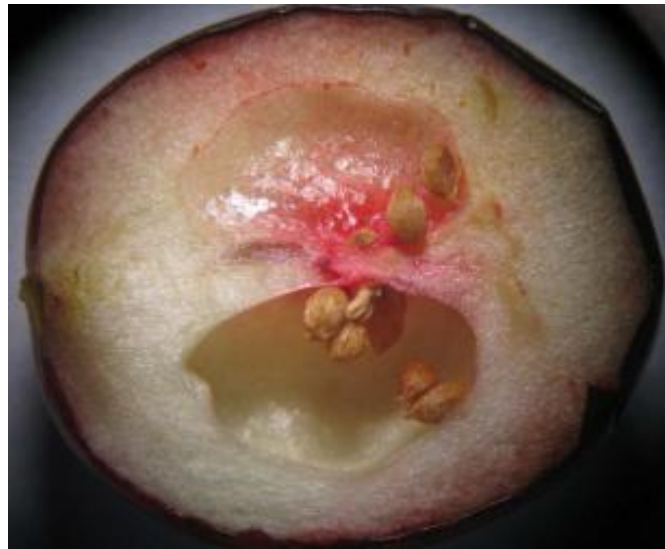


Рис. 1.3 Поперечний зріз плоду журавлини з візуалізацією перикарпію, світлої м'якоті та насінних камер із насінням (стереомікроскопія) [9]

Після висушування плоди зменшуються в розмірах, набувають темно-червоного або майже чорного забарвлення, а їх поверхня стає зморшкуватою, але зберігає слабкий блиск. Висушені ягоди мають губчасту, щільну консистенцію та зберігають чотирикамерну внутрішню будову з тонкими перегородками між гніздами [9, 11].

Подрібнена сировина плодів характеризується інтенсивним червоно-малиновим забарвленням порошку, що є діагностичною ознакою для ідентифікації [9, 12].

Органолептично свіжі плоди мають характерний фруктовий аромат без ознак ферментації або псування, тоді як висушені – слабо виражений, злегка

солодкуватий запах. Смак як свіжих, так і сухих ягід різко кислий, терпкий, з борошнистою текстурою м'якоті [9].

Мікроскопічне дослідження плодів показує, що екзокарп утворений багатокутними клітинами з товстою кутикулою та антоціановим вмістом; клітинні стінки між групами клітин потовщені, тоді як у межах груп залишаються тонкими (рис. 1.4, 1). Мезокарп представлений великими тонкостінними паренхімними клітинами, серед яких трапляються пучки спірально потовщених судин (рис. 1.4, 2). Оболонка насінини складається з кількох шарів клітин, зовнішній з яких утворений радіально видовженими слизонаповненими клітинами з характерним U-подібним потовщенням стінок (рис. 1.4, 3, 4). Ендосперм складається з дрібних полігональних клітин, що містять краплини олії [9].

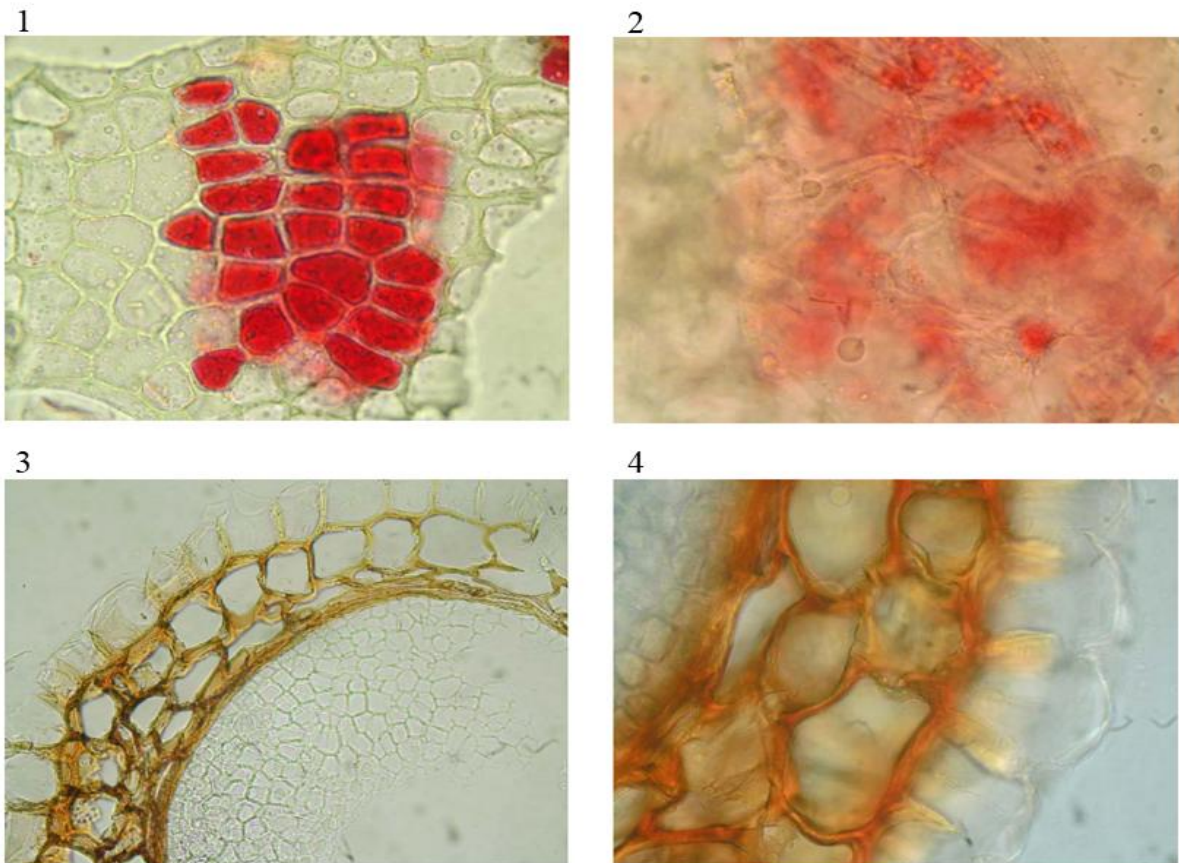


Рис. 1.4 Мікроскопічні діагностичні ознаки плоду журавлини: 1 – екзокарп з антоціановим пігментом; 2 – мезокарп (порошок); 4 – насінна оболонка, поперечний зріз; 5 – деталь поперечного зрізу насінної оболонки [9]

## 1.2 Ареал зростання рослини, заготівля сировини

У природних умовах журавлина великоплода адаптована до екосистем із низьким рівнем трофності. Вона зростає переважно на болотах, торфовищах, у заболочених пониженнях рельєфу та на берегах водойм, формуючи стійкі фітоценози на кислих ґрунтах із високим вмістом органічної речовини. Такі біотопи сформувалися переважно в постльодовиковий період у котловинах-кетлах, заповнених водою та органічними відкладами, що зумовило специфічні умови для розвитку виду [9, 13].

Природний ареал журавлини великоплодої охоплює північні регіони Північної Америки, де вона здавна культивується і є важливою сільськогосподарською культурою [9, 14]. Унаслідок інтродукції рослина широко вирощується та частково натуралізувалася в країнах Європи, зокрема в Польщі, Латвії та інших державах Східної Європи, а також у Чилі [9, 15, 16]. В Україні вид вирощують переважно на Поліссі, в Карпатах і на Прикарпатті, на болотних і заболочених територіях [10].

Культивування даної культури здійснюється на спеціально підготовлених ділянках із кислою реакцією ґрунтового середовища; оптимальний показник рН становить 4,0–5,5. Перше комерційне плодоношення можливе приблизно через три роки після висаджування, тоді як повна продуктивність насаджень досягається через 5–7 років; за належного догляду плантації можуть залишатися продуктивними протягом 60–100 років [17, 18].

Заготівлю плодів *O. macrocarpus* проводять у період повної стиглості, що зазвичай припадає на вересень–листопад, приблизно через 11–13 тижнів після завершення цвітіння. Основним критерієм стиглості є інтенсивне червоне забарвлення, зумовлене накопиченням антоціанових пігментів [15]. Для промислової переробки переважно застосовують метод водного збирання, який базується на здатності плодів спливати на поверхню води, тоді як продукцію, призначену для реалізації у свіжому вигляді, заготовляють сухим способом з мінімальним механічним ушкодженням [9].

Дотримання оптимальних умов заготівлі та первинної обробки сировини має суттєве значення для збереження її якості, оскільки надмірне механічне навантаження, тривале перебування плодів у воді або порушення температурного режиму можуть призводити до фізіологічних ушкоджень і зниження товарних та біологічно активних характеристик сировини [19, 20].

Після збирання плоди журавлини великоплодої підлягають очищенню та сортуванню з використанням механічних або оптичних методів, після чого реалізуються у свіжому вигляді або спрямовуються на подальшу переробку. Переважна частка врожаю використовується для виробництва харчових продуктів і напоїв, зокрема соків, соусів, джемів та функціональних продуктів, тоді як менша частина надходить у продаж як свіжа або заморожена продукція [9, 18].

За даними літератури, плоди журавлини за дотримання стандартних умов зберігання характеризуються відносно високою стабільністю, при цьому термін зберігання свіжих ягід становить 60–120 діб за температури 2–4 °C і відносної вологості 90–95 %. Для продуктів переробки журавлини (сушені, заморожені плоди, соки, концентрати, пюре та порошки) термін зберігання варіює від кількох тижнів після відкриття до 24–36 місяців за умов заморожування або контрольованого температурно-вологісного режиму [9].

Слід зазначити, що листя журавлини великоплодої не є офіційною лікарською рослинною сировиною, у зв'язку з чим його промислова заготівля та стандартизовані умови збору в літературі практично не описані.

### 1.3 Хімічний склад журавлини великоплодої

У контексті харчового складу плодів журавлини великоплодої доцільно відзначити їхній вміст основних вітамінів і макронутрієнтів, що визначає їхню харчову та функціональну цінність. За даними бази харчових продуктів Міністерства сільського господарства США (USDA FoodData Central), у 100 г свіжих ягід журавлини міститься близько 46 ккал енергії, приблизно 12 г вуглеводів, у тому числі 4,0–4,6 г харчових волокон, а також незначні кількості

білка та жирів. Серед мікронутрієнтів плоди характеризуються помірним вмістом вітаміну С (близько 13–16 мг/100 г) [21]. Порівняльні літературні дані також вказують, що у стиглих плодах окремих сортів, зокрема «Ben Lear», вміст аскорбінової кислоти може досягати 15,8 мг/100 г, тоді як вітаміни групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>) та вітамін Е присутні у значно нижчих концентраціях і не визначають вітамінний профіль плодів [22, 23].

Поряд із вітамінним компонентом важливою складовою хімічного складу плодів є мінеральні речовини. Мінеральний склад плодів журавлини великоплодої було досліджено Карлсоном зі співавторами з використанням методів атомно-абсорбційної спектроскопії та ICP-OES [24]. У плодах журавлини виявлено макроелементи (N, P, K, Ca, Mg, S) та мікроелементи (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, B), серед яких домінує калій, а серед мікроелементів – залізо і манган. Показано статистично значущі відмінності вмісту окремих елементів між культивованими та дикорослими зразками [23, 24].

Кількісний аналіз органічних кислот у плодах журавлини засвідчив наявність лимонної, яблучної та хінної кислот, при цьому яблучна і лимонна кислоти виявлялися у всіх досліджених сортах, а концентрація хінної кислоти зменшувалася в процесі досягання плодів [25, 26].

Фенольні кислоти представлені переважно похідними гідроксикоричних кислот, серед яких домінує хлорогенова кислота. Сумарний вміст фенольних кислот у плодах різних сортів коливається в межах 3,48–10,68 мг/г сухої маси (СМ) та значною мірою залежить від генотипу і стадії стиглості [27–29].

Аналіз літературних даних свідчить, що флавонольний профіль плодів журавлини формується переважно глікозидами кверцетину та мірицетину, серед яких домінують кверцетин-3-галактозид і мірицетин-3-галактозид (табл. 1.1). Кількісний вміст основних флавонолів відзначається суттєвою якісною та кількісною варіабельністю, що визначається генотиповими особливостями сортів і стадіями стиглості плодів [27, 28].

Таблиця 1.1

**Флавоноли, ідентифіковані у плодах журавлини великоплодої  
(*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh), мг/г сухої маси**

Назва флавонолу	Вміст за даними Гудзінскайте та співавт. [27], мг/г сухої маси	Вміст за даними Озмянського та співавт. [28], мг/г сухої маси <sup>a</sup>
Кверцетин-3-галактозид	0,72 ± 0,05 – 2,41 ± 0,21	0,186 ± 0,019 – 0,412 ± 0,038
Кверцетин-3-глюкозид	0,18 ± 0,02 – 0,91 ± 0,08	0,064 ± 0,007 – 0,189 ± 0,016
Кверцетин-3-арабінозид	0,07 ± 0,01 – 0,39 ± 0,03	0,091 ± 0,010 – 0,243 ± 0,024
Кверцетин-3-рамнозид	0,09 ± 0,01 – 0,48 ± 0,04	0,032 ± 0,004 – 0,097 ± 0,011
Кверцетин-3-ксилозид	н.д.	0,021 ± 0,003 – 0,068 ± 0,007
Кверцетин-3-рутинозид	н.д.	0,014 ± 0,002 – 0,039 ± 0,005
Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -бензоїл)-галактозид	0,12 ± 0,02 – 0,63 ± 0,06	0,028 ± 0,004 – 0,086 ± 0,010
Мірицетин-3-галактозид	0,41 ± 0,04 – 1,76 ± 0,15	0,076 ± 0,008 – 0,225 ± 0,021
Мірицетин-3-глюкозид	н.д.	0,023 ± 0,003 – 0,069 ± 0,008
Мірицетин-3-арабінозид	0,07 ± 0,01 – 0,39 ± 0,03	0,031 ± 0,004 – 0,088 ± 0,010
Мірицетин-3-рамнозид	н.д.	0,012 ± 0,002 – 0,034 ± 0,004
Мірицетин-3-ксилозид	н.д.	0,009 ± 0,001 – 0,026 ± 0,003
Кемпферол-3-галактозид	н.д.	0,011 ± 0,002 – 0,032 ± 0,004
Кемпферол-3-глюкозид	н.д.	0,008 ± 0,001 – 0,025 ± 0,003
Кемпферол-3-арабінозид	н.д.	0,007 ± 0,001 – 0,021 ± 0,003
Кемпферол-3-рамнозид	н.д.	0,005 ± 0,001 – 0,018 ± 0,002
Ізорамнетин-3-галактозид	н.д.	0,009 ± 0,001 – 0,027 ± 0,003
Ізорамнетин-3-глюкозид	н.д.	0,006 ± 0,001 – 0,020 ± 0,003
Ізорамнетин-3-арабінозид	н.д.	0,005 ± 0,001 – 0,016 ± 0,002

Примітки:

1. н.д. – кількісні дані у відповідному дослідженні не наведені;
2. <sup>a</sup> – дані джерела [28] подані в оригіналі в мг/100 г сухої маси, перераховано в мг/г сухої маси шляхом ділення на 100 з метою уніфікації одиниць виміру.

Кількісна структура флавонолів плодів вирощених у Латвії узгоджується з наведеними даними та свідчить про чітке домінування чотирьох сполук – кверцетин-3-галактозиду, мірицетин-3-галактозиду, кверцетин-3- $\alpha$ -L-арабінозиду та кверцетин-3-рамнозиду, сумарна частка яких становить 91,16–93,85 % від загальної кількості ідентифікованих флавонолів [5]. Найбільшу частку у флавонольному профілі займає кверцетин-3-галактозид ( $39,63 \pm 4,36$  %), далі – мірицетин-3-галактозид ( $25,03 \pm 4,36$  %), кверцетин-3- $\alpha$ -L-арабінозид ( $17,80 \pm 3,06$  %) та кверцетин-3-рамнозид ( $9,94 \pm 2,52$  %). Загальний вміст флавонолів у плодах досліджених сортів варіює у широких межах – від  $1256,45 \pm 22$  до  $4327,29 \pm 113$  мкг/г СМ, при цьому максимальні значення зафіксовано у плодах сорту «Stevens», зібраних у середині серпня, тоді як мінімальні – у плодах сорту «Lemunyon», що підтверджує істотний вплив сортових особливостей і строків збирання на формування флавонольного складу журавлини.

Аналіз опублікованих експериментальних даних свідчить, що у плодах журавлини великоплодої домінуючим представником групи флаван-3-олів є проціанідин А-типу [26–29]. Кількісний аналіз засвідчив, що для екстрактів плодів усіх досліджених сортів цієї рослини характерна однакова ієрархія вмісту флаван-3-олів, яка у порядку зменшення концентрації може бути представлена таким чином: проціанідин А-типу > (-)-епікатехін > (+)-катехін > проціанідини В типу. Найвищу сумарну кількість ідентифікованих сполук флаван-3-ольної групи зафіксовано у зразках плодів сорту «Searles», де вона становила  $131,78 \pm 5,29$  мг/г [27].

За даними опублікованих експериментальних досліджень, у плодах журавлини великоплодої домінують чотири глікозильовані сполуки антоціанінового ряду, а саме: пеонідин-3-О-галактозид, пеонідин-3-арабінозид, ціанідин-3-галактозид і ціанідин-3-арабінозид [5, 23, 31]. Частка цих компонентів істотно змінюється впродовж процесу досягання плодів: вміст пеонідин-3-галактозиду коливається в межах від 6,77 % до 36,24 %, пеонідин-3-арабінозиду – від 0,89 % до 11,42 %, ціанідин-3-галактозиду – від 26,66 % до 50,32 %, тоді як

частка ціанідин-3-арабінозиду становить 18,18–32,42 % від сумарної кількості антоціанінів [5].

Узгоджені результати отримано й в інших дослідженнях плодів журавлини, де встановлено, що основну частку антоціанінового комплексу формують пеонідин-3-галактозид (32,7 %) і ціанідин-3-галактозид (20,5 %), тоді як вміст пеонідин-3-арабінозиду та ціанідин-3-арабінозиду є нижчим і становить відповідно 6,7 та 19,0 % [26].

Окрім зазначених сполук, у складі антоціанінів плодів журавлини великоплодої також було ідентифіковано дельфінідин-3-глюкозид, при цьому найбільше його кількісне значення зафіксовано у плодах сорту «Howes» і становило  $43,87 \pm 0,35$  мг/100 г сухої маси [29].

Плоди журавлини великоплодої характеризуються високим вмістом тритерпеноїдів, серед яких домінує урсолова кислота [28, 29]. Частка становить  $68,31 \pm 0,95$  % від сумарного вмісту тритерпеноїдів і фітостеролів, тоді як концентрації олеанолової, корозолової та маслінової кислот, а також  $\alpha$ - і  $\beta$ -аміринів є істотно нижчими [29]. Загальний вміст тритерпеноїдів у плодах різних сортів коливається в межах  $4215,78 \pm 45$ – $6232,74 \pm 123$  мкг/г, а вміст  $\beta$ -ситостеролу – від  $733,88 \pm 21$  до  $1040,98 \pm 33$  мкг/г, що свідчить про виражену міжсортову мінливість [29].

Літературні дані свідчать про істотний вплив стадії стиглості на накопичення тритерпеноїдів у плодах журавлини. Середній сумарний вміст цих сполук у різних культиварах становить 2528,0–3201,5 мг/кг СМ, при цьому у сортах «Pilgrim», «Stevens» і «Ben Lear» у процесі досягання він зростає на 9,0–24,1 % від незрілої до товарної стиглості [29, 30]. Урсолова кислота залишається провідним індивідуальним тритерпеноїдом; її частка складає 22,7–32,2 % від загального вмісту тритерпеноїдів, хоча для окремих сортів у період досягання відмічено тенденцію до її зниження [29]. За узагальненими літературними даними, абсолютний вміст урсолової кислоти у свіжих плодах журавлини може коливатися в межах 60–110 мг/100 г сирої маси, що підтверджує її ключову роль у формуванні тритерпеноїдного профілю рослинної сировини [32].

Аналіз наукових джерел показав, що експериментальні дослідження хімічного складу журавлини зосереджені виключно на плодах, тоді як дані щодо хімічного складу листя *O. macrocarpus* є фрагментарними та обмежуються аналізом летких сполук, визначених методами газової хроматографії з мас-спектрометрією, у межах яких ідентифіковано переважно терпенові сполуки, альдегіди, спирти, кетони та ефіри [33]. Це зумовлює наукову доцільність проведення системних досліджень, спрямованих на цілеспрямоване вивчення хімічного складу листя журавлини як перспективного виду рослинної сировини.

#### 1.4 Фармакологічна активність біологічно активних речовин журавлини великоплодої

##### 1.4.1 Антиоксидантна активність

Антиоксидантні властивості журавлини широко описані в сучасних експериментальних дослідженнях і пов'язуються передусім із високим вмістом поліфенольних і тритерпенових сполук. За результатами порівняльних експериментальних досліджень плодів трьох сортів журавлини («Ben Lear», «Pilgrim», «Stevens»), вирощених у Польщі, встановлено, що сорт «Pilgrim» характеризується найвищими показниками антиоксидантної активності за тестами ABTS та FRAP, перевищуючи інші сорти на 9,8–16,9 %. При цьому у всіх досліджуваних сортах відзначено зростання антиоксидантної активності зі збільшенням ступеня зрілості плодів [30]. Повідомляється також, що сік журавлини ефективно нейтралізує супероксидні та 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразильні радикали з показниками  $IC_{50}$  27 мкг/мл і 177 мкг/мл відповідно [34].

У низці *in vitro* досліджень показано, що етанольні фракції соку журавлини, зокрема фракції з конденсованими танінами, підвищують життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки людини за умов синьо-світлово індукованого оксидативного стресу, що пов'язують із їх радикалопоглинаючою активністю [35]. В експериментальних *in vivo* моделях введення журавлинового соку або

концентратів, багатих на проантоціанідини типу А, супроводжувалося підвищенням загальної антиоксидантної активності органів, зниженням рівня малонового діальдегіду та зростанням активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази – за умов старіння, токсичного та медикаментозно індукованого оксидативного стресу [36–39].

#### 1.4.2 Протизапальна активність

Запалення є універсальним патогенетичним механізмом розвитку багатьох хронічних захворювань і реалізується через активацію низки сигнальних каскадів, зокрема NF-κB, MAPK, JAK-STAT та PI3K. У цьому контексті експериментальні *in vitro* дослідження свідчать, що журавлина та продукти її переробки виявляють протизапальну активність, яку пов'язують із високим вмістом поліфенольних сполук. Зокрема, у клітинних моделях остеоартриту скронево-нижньощелепного суглоба високомолекулярна недіалізована фракція журавлинового соку інгібувала продукцію ІЛ-6, ІЛ-8 та VEGF і знижувала ядерну активацію NF-κB та MAPK/AP-1 без впливу на життєздатність клітин [40].

Літературні джерела свідчать, що в ліпополісахаридом індукованих моноцитах людини TLR-1 екстракт з плодів журавлини пригнічував експресію генів, пов'язаних із запальною відповіддю, зокрема TNF-α, а також модулював експресію імунорегуляторних генів; при цьому рівень протизапальної активності залежав від сорту та регіону вирощування журавлини [41, 42]. Механістичні дослідження свідчать, що екстракти з плодів журавлини інгібують ядерну транслокацію NF-κB, знижують активність COX-2 та модулюють поляризацію макрофагів у напрямі протизапального фенотипу M2 [43–46].

Результати *in vivo* та клінічних досліджень узгоджуються з експериментальними даними: у пацієнтів із ревматоїдним артритом споживання журавлинового соку асоціювалося зі зниженням індексу активності ревматоїдного артриту (DAS28) і рівня антитіл до циклічного цитрулінованого пептиду, а в експериментальній моделі коліту – зі зменшенням вираженості запалення та

нормалізацією кишкової мікробіоти [47–49]. Водночас у пацієнтів із хронічною хворобою нирок короткотривале застосування сухого екстракту з плодів журавлини не супроводжувалося статистично значущими змінами біохімічних показників, що свідчить про необхідність подальших досліджень [50].

#### 1.4.3 Гіполіпідемічна та антидіабетична активність

Порушення ліпідного та вуглеводного обміну відіграють ключову роль у патогенезі ожиріння та цукрового діабету II типу, що зумовлює інтерес до природних біоактивних сполук із потенціалом метаболічної корекції.

У цьому зв'язку результати *in vitro* досліджень демонструють здатність біоактивних сполук журавлини впливати на регуляцію ліпідного обміну. Повідомляється, що екстракти з плодів журавлини пригнічують диференціацію адипоцитів, накопичення ліпідів і продукцію активних форм кисню в клітинах 3T3-L1 без впливу на їх життєздатність [51]. Дані, отримані на модельних організмах, свідчать, що водорозчинні екстракти з плодів журавлини, стандартизовані за вмістом проантоціанідинів, дозозалежно знижують накопичення жиру шляхом регуляції експресії генів, пов'язаних із ліпідним метаболізмом, що вказує на залучення сигнальних шляхів, аналогічних стерол-регуляторного елемент-зв'язувального білка-1 та  $\alpha$ -рецептора, активованого проліфераторами пероксисом, у ссавців [52].

Результати *in vivo* досліджень підтверджують метаболічну активність плодів журавлини в умовах дієт-індукованого ожиріння. Згідно з літературними даними, екстракти журавлини та продукти її переробки знижують приріст маси тіла, гіпертригліцеридемію й гіперхолестеринемію, а також маркери ліпідної пероксидації та запалення, одночасно покращуючи енергетичний обмін і функціональний стан жирової тканини [53–56]. Зазначені ефекти пов'язують з підвищенням термогенної активності бурої жирової тканини та модуляцією кишкової мікробіоти зі збільшенням продукції коротколанцюгових жирних кислот [57, 58].

#### 1.4.4 Антимікробна активність

Антимікробні властивості плодів журавлини описані в експериментальних і клінічних дослідженнях та охоплюють бактерицидну й бактериостатичну активність, що пов'язують із вмістом поліфенолів та інших біоактивних фітохімічних сполук. За даними літератури, екстракти з плодів журавлини та продукти її переробки інгібують ріст грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, зокрема *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Salmonella enterica*, у тому числі штамів із множинною лікарською резистентністю [59–61]. Повідомляється також, що проантоціанідини з плодів журавлини здатні потенціювати дію  $\beta$ -лактамних антибіотиків і пригнічувати активність  $\beta$ -лактамаз, у тому числі в ізолятах *Escherichia coli*, що продукують  $\beta$ -лактамази розширеного спектра дії та метало- $\beta$ -лактамази [62].

Літературні дані свідчать, що антимікробна активність плодів журавлини має прикладне значення для профілактики та допоміжної терапії інфекцій сечових шляхів, інфекцій, асоційованих із *Helicobacter pylori*, а також мікробіотних порушень. В експериментальних моделях і клінічних дослідженнях показано, що споживання журавлинового соку або екстрактів з плодів знижує колонізацію уропатогенних *Escherichia coli*, порушує адгезію фімбрійованих штамів до епітелію та модулює склад кишкової й урогенітальної мікробіоти [58, 63–65].

За даними експериментальних досліджень, екстракти листя та стебел журавлини великоплодої (*Vaccinium macrocarpon*) проявляють антимікробну активність щодо стандартних тест-штамів *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та *Candida albicans* ATCC 14053; при цьому екстракти листя характеризувалися вищою біологічною активністю порівняно з екстрактами стебел [33].

#### 1.4.5 Гепатопротекторна активність

За даними експериментальних досліджень *in vivo*, біоактивні сполуки плодів журавлини проявляють гепатопротекторну активність за умов токсичного, дієт-індукованого та метаболічного ураження печінки. У моделях неалкогольної жирової хвороби печінки, індукованої високожировою або високожирово-високовуглеводною дієтою, поліфенол- і проантоціанідин-збагачені екстракти з плодів журавлини знижували активність печінкових ферментів, ступінь стеатозу та гістологічні ушкодження, а також пригнічували оксидативний стрес і запальну відповідь шляхом модуляції експресії генів, пов'язаних із NF- $\kappa$ B, TLR4 (толл-подібного рецептора 4), NLRP3-інфламасомою (інфламасоми родини NOD-подібних рецепторів родини піринів 3), ліпогенезом і  $\beta$ -окисненням жирних кислот [66–69]. У моделях хімічно індукованого ураження печінки (CCl<sub>4</sub>, естроген-індукований холестаза, етанол) застосування журавлини асоціювалося зі зменшенням проявів оксидативного ушкодження, запалення та фіброзу, підвищенням активності антиоксидантних ферментів і пригніченням сигнальних шляхів TGF- $\beta$ /Smad (трансформувального фактора росту  $\beta$  та білків родини Smad) та MAPK, залучених до прогресування фіброзу [70–72].

Клінічні спостереження узгоджуються з експериментальними даними та підтверджують потенціал плодів журавлини як допоміжного засобу при метаболічних ураженнях печінки. Так, у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки застосування добавок на основі журавлини протягом 12 тижнів супроводжувалося зниженням активності аланінамінотрансферази та показників інсулінорезистентності, що свідчить про покращення функціонального стану печінки та метаболічного профілю [73].

#### 1.4.6 Антигіпертензивна та кардіопротекторна активність

Літературні дані свідчать, що споживання плодів журавлини асоціюється з антигіпертензивною та кардіопротекторною дією, що підтверджено результатами

експериментальних і клінічних досліджень. В *in vivo* моделях показано, що журавлиновий сік і екстракти з плодів сприяють зниженню артеріального тиску, покращенню ендотелій-залежної вазодилатації та модуляції ренін-ангіотензинової системи, що супроводжується зниженням експресії ACE1 (ангіотензинперетворювального ферменту 1), COX-2, MCP-1 (моноцитарного хемоатрактантного білка-1), маркерів судинного запалення й оксидативного стресу [74–76]. У моделях токсично індукованої кардіоміопатії застосування журавлини асоціювалося з кардіопротекторним ефектом, зокрема з покращенням показників міокардіального ушкодження, судинної функції та гістологічної структури серцевої тканини, у тому числі при комбінуванні з антигіпертензивними препаратами [77].

Результати клінічних досліджень і метааналізів рандомізованих контрольованих випробувань узгоджуються з експериментальними даними та вказують, що регулярне споживання журавлинового соку асоціюється зі зниженням систолічного й діастолічного артеріального тиску, рівнів тригліцеридів і С-реактивного білка, а також зі зменшенням серцево-судинного ризику, причому антигіпертензивний ефект є більш вираженим у осіб старшого віку [78, 79].

#### 1.4.7 Протипухлинна активність

За даними досліджень *in vitro*, біоактивні сполуки плодів журавлини характеризуються здатністю пригнічувати проліферацію та індукувати загибель пухлинних клітин різного походження. Зокрема, біоконвертовані проантоціанідини плодів журавлини посилювали цитотоксичну дію щодо клітин гепатоцелюлярної карциноми лінії HepG2, що супроводжувалося виснаженням мітохондріального аденозинтрифосфату і частковою активацією каспаз 3/7 [80]. Повідомляється також, що проантоціанідин-багачений екстракт з плодів журавлини індукував аутофагічну загибель або некроз у клітинах аденокарциноми стравоходу EAC [81]. Антипухлинну активність А-типу проантоціанідинів відзначено також щодо клітин

гострого мієлоїдного лейкозу (AML) і колоректального раку HCT116, що пов'язують із зупинкою клітинного циклу та індукцією апоптозу [82, 83].

Результати досліджень *in vivo* узгоджуються з клітинними даними та свідчать, що додавання плодів журавлини до раціону або застосування її поліфенольних фракцій пригнічує кишковий пухлиногенез, зменшуючи частоту, розмір і кількість пухлин, рівень клітинної проліферації та продукцію прозапальних цитокінів. Зазначені ефекти асоціюються з модуляцією сигнальних шляхів PI3K/Akt/COX-2 (фосфатидилінозитол-3-кіназного шляху, протеїнкінази Akt та циклооксигенази-2), а також регуляцією процесів апоптозу й ангіогенезу без проявів токсичності [84–86].

### 1.5 Фармакопейний статус і напрями застосування журавлини великоплодої

Незважаючи на значний обсяг експериментальних і клінічних даних щодо біологічної активності плодів журавлини великоплодої, її фармакопейний статус як лікарської рослинної сировини є обмеженим. Станом на сьогодні журавлина не включена до чинної Державної фармакопеї України, а лікарські засоби на її основі відсутні у Державному реєстрі лікарських засобів України [87, 88].

Водночас журавлина та продукти її переробки описані в зарубіжних галузевих стандартах і гербальних монографіях, зокрема в American Herbal Pharmacopoeia, яка регламентує вимоги до якості, ідентифікації, умов зберігання та термінів придатності плодів журавлини як рослинної сировини для харчових і функціональних продуктів, а не як лікарської рослинної сировини [9]. У Європейській фармакопеї журавлина також не має статусу офіційної лікарської рослинної сировини, однак широко використовується в складі харчових продуктів спеціального призначення та нутрицевтичних форм [4, 89, 90].

Основними формами практичного використання журавлини є свіжі й заморожені плоди, соки, концентрати, порошки та екстракти, які застосовуються переважно з профілактичною метою, зокрема для зниження ризику інфекцій сечових шляхів, підтримки серцево-судинного здоров'я та метаболічної

рівноваги [4, 9, 91]. Такі напрями застосування ґрунтуються на експериментальних і клінічних даних, однак реалізуються поза межами офіційної лікарської практики.

За даними етноботанічних джерел, надземні частини журавлини великоплодої, зокрема листя, використовувалися в народній медицині у вигляді водних настоїв і відварів, зокрема при запальних захворюваннях дихальних шляхів та для полегшення симптомів нудоти [92].

Отже, сучасний регуляторний статус журавлини великоплодої характеризується наявністю значного наукового підґрунтя щодо фармакологічної активності за відсутності офіційної фармакопейної стандартизації як лікарської рослинної сировини в Україні та в більшості країн Європи. Це обґрунтовує доцільність подальших фармакогностичних досліджень, спрямованих на поглиблене вивчення хімічного складу та біологічної активності журавлини, зокрема її вегетативних органів, як перспективної рослинної сировини.

Огляд джерел літератури показав, що журавлина великоплода (*Oxycoccus macrocarpos* (Aiton) Pursh; *Vaccinium macrocarpon* Aiton) є перспективною рослиною, ботанічна характеристика якої описана на рівні виду, тоді як систематизовані дані щодо хімічного складу та біологічної активності стосуються переважно плодів. Узагальнені літературні відомості свідчать про багатокomпонентний хімічний склад плодів, зокрема наявність органічних кислот, поліфенольного комплексу (фенольні кислоти, флавоноли, антоціаніни, флаван-3-оли) та тритерпеноїдів, що зумовлює широкий спектр фармакологічних активностей: антиоксидантну, протизапальну, гіполіпідемічну й антидіабетичну, антимікробну, гепатопротекторну, антигіпертензивну та кардіопротекторну, а також протипухлинну.

Водночас встановлено, що журавлина великоплода не має фармакопейного статусу як лікарська рослинна сировина в Україні, а в зарубіжних гербальних монографіях її плоди розглядаються переважно як сировина для харчових і функціональних продуктів. Дані щодо хімічного складу та біологічної активності вегетативних органів (листя, пагонів) є обмеженими й фрагментарними, а відомості

про їх фармакогностичні характеристики практично відсутні. У зв'язку з цим доцільним є проведення цілеспрямованих фармакогностичних досліджень журавлини великоплодої, спрямованих на вивчення хімічного складу та біологічного потенціалу вегетативних органів і наукове обґрунтування можливості їх подальшого використання як рослинної сировини.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1 Заготівля сировини

Об'єктами дослідження були зразки листя, плоди та пагони журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh; *Vaccinium macrocarpon* Aiton), а також листя та пагони журавлини болотної (*Oxycoccus palustris* Pers.; *Vaccinium oxycoccos* L.), заготовлені у різних природно-кліматичних регіонах України протягом 2019–2021 років. Заготівлю сировини здійснювали у Київській області – в Обухівському районі (50.109938, 30.6298846) у вересні 2019 року та в околицях м. Переяслав (50.10314334026342, 31.46151900698126) у серпні 2020 року. Крім того, зразки збирали у Волинській області (Маневицький район, с. Нова Руда, 51.436369500413896, 25.33982442767006) та Житомирській області (с. Костівці, 50.326862437345945, 29.54310845594284) у жовтні 2021 р.

Журавлину болотну обрано як об'єкт дослідження для порівняння, оскільки цей вид історично ширше застосовувався в європейській медичній та фармацевтичній практиці та характеризується достатнім рівнем наукової вивченості.

Видову належність рослинної сировини встановлювали за консультативної участі доктора фармацевтичних наук, професора Тетяни Гонтової. Ваучерні гербарні зразки рослин під номерами 592–594 депоновані на кафедрі фармакогнозії Національного фармацевтичного університету (м. Харків, Україна).

Зібрані листя та пагони висушували за кімнатної температури у добре вентиляваному приміщенні протягом десяти діб. Після висушування рослинний матеріал зберігали у паперових пакетах до моменту проведення подальших досліджень. Плоди журавлини великоплодої зберігали в замороженому стані та використовували виключно для аналізу вмісту макро- та мікроелементів, оскільки їх хімічний склад та фармакологічні активності достатньо висвітлені у науковій літературі.

## 2.2 Методика макро- та мікроскопічного аналізу сировини

Макро- та мікроскопічний аналіз лікарської рослинної сировини проводили з дотриманням загальних фармакопейних підходів, регламентованих Державною фармакопеею України [93], за безпосередньої участі та консультацією професора, доктора фармацевтичних наук Т. М. Гонтової. Первинну макроскопічну оцінку сировини проводили шляхом візуального огляду із застосуванням лупи, а також бінокулярного мікроскопа МБС-9.

Для встановлення анатомічних особливостей пагонів журавлини великоплодої та журавлини болотної вивчали як цілі, так і механічно подрібнені зразки рослинного матеріалу. Перед проведенням мікроскопічного аналізу зразки фіксували у консервувальній суміші, що складалася з 96 % етанолу, гліцерину та очищеної води у рівних об'ємних частках. Дослідження структурної організації стебел і листків здійснювали на поперечних зрізах, тоді як мікроскопічні характеристики епідермальних тканин аналізували шляхом вивчення препаратів із поверхні.

Порошкоподібні зразки одержували шляхом подрібнення рослинної сировини з подальшим фракціонуванням відповідно до загальноприйнятих вимог ситового аналізу. Для покращення візуалізації анатомічних елементів препарати освітлювали з використанням розчину хлоралгідрату. Мікроскопічне дослідження поперечних і поздовжніх зрізів, а також препаратів епідермісу та поверхневих препаратів проводили із застосуванням світлових мікроскопів МБС-9 та МС-10 з різними комбінаціями окулярів ( $\times 5$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ ) і об'єктивів ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ). Окремі мікроскопічні спостереження здійснювали за допомогою мікроскопа Micromed XS- 4130, оснащеного окуляром WF15 $\times$  та об'єктивами  $\times 10/0,25$  і  $\times 40/0,65$ , що дозволяло отримувати зображення з підвищеною роздільною здатністю.

Результати макро- та мікроскопічних спостережень документували шляхом цифрової фотофіксації з використанням камери Canon IXUS 220 HS.

### 2.3 Методика визначення елементного складу надземних органів журавлини великоплодої та екстракту з її листя

Елементний склад рослинної сировини та екстракту визначали методом атомно-емісійної спектрометрії з використанням спектрофотометра ДФС-8 на базі Інституту монокристалів НАН України. Для проведення аналізу використовували попередньо висушену та подрібнену рослинну сировину, тоді як плоди аналізували у замороженому стані. Наважки зразків піддавали обробці концентрованою сульфатною кислотою з подальшим обуглюванням у муфельній печі за температури не вище 500 °С протягом 1 год. Після завершення мінералізації зразки випаровували безпосередньо з кратерів графітових електродів.

Реєстрацію атомно-емісійних спектрів проводили за стандартних умов збудження: сила струму дуги змінного струму становила 16 А, фаза підпалу – 60°, частота імпульсів – 100 розрядів за секунду, аналітичний проміжок – 2 мм, ширина щілини спектрографа – 0,015 мм, час експозиції – 60 с. Як джерело збудження спектрів застосовували генератор типу ІВС-28. Спектри реєстрували на фотопластинках за допомогою спектрографа ДФС-8, оснащеного трилінзовою системою освітлення щілини та дифракційною ґраткою з щільністю 600 штрихів/мм.

Інтенсивність спектральних ліній аналізованих елементів вимірювали за допомогою мікрофотометра МФ-4 у діапазоні довжин хвиль 240–347 нм шляхом порівняння з державними стандартними зразками сумішей мінеральних елементів. Після проявлення та висушування фотопластинок проводили фотометрування аналітичних ліній і відповідних фонових ділянок як для досліджуваних зразків, так і для стандартів.

Для кожного елемента розраховували різницю почорніння між спектральною лінією та фоном, на підставі чого будували калібрувальні графіки у координатах «середнє значення різниці почорніння – логарифм концентрації елемента у стандартному зразку». За отриманими графіками визначали вміст відповідних елементів у золі, виражений у масових відсотках.

Концентрацію елементів у вихідному рослинному матеріалі розраховували за формулою (2.1):

$$X = \frac{a \cdot m}{M}, \quad (2.1)$$

де  $m$  – маса золи, г;

$M$  – маса взятої для аналізу сировини, г;

$a$  – концентрація елемента в золі за графіком, %.

Вміст елементів у вихідному рослинному матеріалі розраховували з урахуванням маси золи та маси наважки сировини. Методика була придатною для визначення як макро-, так і мікроелементів. Діапазон визначуваних концентрацій у золі (мас. %) становив: Mn – від  $2 \cdot 10^{-4}$  до 1; Cu – від  $1 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-2}$ ; Ni, Ge, Pb, Ga, Ag, Sn – від  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$ ; Cd – від  $5 \cdot 10^{-3}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$ ; V, Mo, Co, Cr – від  $2 \cdot 10^{-4}$  до  $1 \cdot 10^{-2}$ ; Ti – від  $5 \cdot 10^{-4}$  до 1; Sr – від  $1 \cdot 10^{-2}$  до 1; Zn – від  $1 \cdot 10^{-2}$  до 2.

Калібрувальні залежності будували в межах відповідних концентрацій з використанням стандартних розчинів солей металів (ICORM-23–27). Відносне стандартне відхилення для п'яти паралельних вимірювань не перевищувало 3 %, що підтверджує відтворюваність і точність застосованої методики [94, 95].

2.4 Методика визначення фенольних сполук методом вискоєфективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням

Ідентифікацію фенольних сполук у листі журавлини великоплодої проводили методом ВЕРХ-ДАД-МС з використанням хроматографічної системи Ultimate 3000 RS (Dionex, США) у поєднанні з мас-спектрометром Amazon SL (Bruker Daltonik, Німеччина). Дослідження виконували на базі Варшавського медичного університету на кафедрі фармацевтичної біології.

Для підготовки проб до ВЕРХ-аналізу зразки листя журавлини великоплодої екстрагували тричі 50 % етанолом методом мацерації у загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:30. Отримані екстракти об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр, після чого етанол видаляли за допомогою роторного випарника (Heidolph Laborota 4000 efficient), а концентрат піддавали ліофілізації. Для хроматографічного аналізу 10 мг сухого екстракту розчиняли в 1 мл суміші метанолу для ВЕРХ та деіонізованої води у співвідношенні 1:1. Перед аналізом зразки фільтрували через мембранні полівініліденфторидні фільтри з розміром пор 0,45 мкм до флакону для ВЕРХ та вводили у ВЕРХ-систему.

Хроматографічне розділення здійснювали на колонці Kinetex ХВ-С18 (150 × 2,1 мм, 1,7 мкм; Торранс, Каліфорнія, США). Як рухомих фаз використовували 0,1 % розчин мурашиної кислоти у деіонізованій воді (фаза А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі (фаза Б). Елюювання проводили у градієнтному режимі: 0 хв – 1 % фази Б, 60 хв – 26 % фази Б. Швидкість потоку становила 0,3 мл/хв; температуру колонки підтримували на рівні 25 °С.

Елюент подавали безпосередньо в джерело електроспрей-іонізації мас-спектрометра. Параметри джерела електроспрей-іонізації становили: тиск розпилювача – 40 psi, потік сухого газу – 9 л/хв, температура сухого газу – 135 °С, капілярна напруга – 4,5 кВ. Аналіз сполук здійснювали в режимах позитивних і негативних іонів. Режим MS/MS був активним; найбільш інтенсивний іон мас-спектра піддавався фрагментації [60]. За допомогою діодно-матричного детектора здійснювали моніторинг УФ-спектрів ідентифікованих сполук у діапазоні довжин хвиль 200–450 нм. Обробку отриманих мас-спектрометричних даних здійснювали з використанням програмного забезпечення DataAnalysis 4.4 SR1 (Bruker Daltonik).

## 2.5 Методика якісного тонкошарового хроматографічного аналізу фенольних сполук листя журавлини великоплодої та журавлини болотної

Якісну оцінку фенольних сполук у листі журавлини великоплодої здійснювали методом ТШХ відповідно до вимог загальної статті 2.2.27 ДФУ з

урахуванням модифікацій, рекомендованих для аналізу рослинної сировини представників родини Ericaceae [93, 96]. Дослідження виконували на базі Варшавського медичного університету із використанням матеріально-технічної бази та аналітичного обладнання лабораторії для виконання досліджень (№ 2.15).

Для дослідження використовували подрібнену рослинну сировину листя журавлини великоплодої та журавлини болотної, стандартизовану за фракційним складом шляхом просіювання через сито з розміром отворів 355 мкм. Наважку сировини масою 1,0 г екстрагували метанолом у кількості 10 мл із застосуванням короткочасного нагрівання на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 4–5 хв. Після охолодження екстракт відфільтровували, а фільтрат упарювали за зниженого тиску із застосуванням роторного випарника до об'єму близько 2 мл.

Хроматографічне розділення компонентів проводили на ТШХ-пластинках із силікагелевим сорбційним шаром 60 F<sub>254</sub> (Merck, Німеччина). Як рухомої фази використовували суміш етилацетату, води, безводної мурашиної та безводної оцтової кислот у співвідношенні 72:14:7:7 (об/об). Випробовувані розчини наносили на стартову лінію в об'ємах 5–20 мкл з метою визначення оптимальних умов якісного розділення зон. Для порівняння застосовували стандартні зразки хлорогенової та кофейної кислот, а також гіперозиду, рутину і кверцетину.

Після проходження фронту рухомої фази на відстань 15 см пластинки висушували за температури 100–105 °С та обробляли реагентами для виявлення фенольних сполук – розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти та розчином макро голу 400 у метанолі. Оцінку хроматограм проводили після сушіння при кімнатній температурі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм.

## 2.6 Методика якісного тонкошарового хроматографічного аналізу фенольних сполук екстракту листя журавлини великоплодої

Якісний аналіз фенольних сполук у екстрактах листя журавлини великоплодої проводили методом тонкошарової хроматографії згідно з вимогами загальної статті 2.2.27 ДФУ, з адаптацією методичних параметрів до об'єкта

дослідження [93]. Експериментальні дослідження екстрактів виконували на базі Варшавського медичного університету.

Розчини для аналізу готували з витягів, одержаних на попередньому етапі дослідження (розд. 4, п. 4.1.2). Стандартні розчини готували шляхом розчинення по 3,0 мг хлорогенової кислоти (кат. № 25700; Fluka Chemie AG, Швейцарія), кверцетину (кат. № Q4951; Sigma-Aldrich, США) та гіперозиду (кат. № 4215.1; Carl Roth GmbH + Co. KG, Німеччина) окремо у 10 мл метанолу.

Хроматографування здійснювали на ТШХ-пластинках із шаром силікагелю (60 F<sub>254</sub>; Merck, Німеччина) з використанням рухомої фази, що складалася з етилацетату, води, безводної мурашиної та безводної оцтової кислот у співвідношенні 72:14:7:7 (*об/об*). На стартову лінію пластинок наносили по 15 мкл досліджуваних і стандартних розчинів у вигляді смуг. Процес хроматографування завершували після проходження фронту рухомої фази на відстань 15 см від лінії старту.

Для візуалізації фенольних компонентів пластинки висушували за температури 100–105 °С і послідовно обробляли розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти та розчином макроголу 400 у метанолі. Аналіз хроматограм здійснювали в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 365 нм після сушіння на повітрі протягом 30 хв.

Ідентифікацію фенольних сполук проводили шляхом зіставлення положення та флуоресцентних характеристик зон випробовуваних розчинів із відповідними зонами стандартних зразків.

## 2.7 Методика кількісного визначення суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту

Вміст суми фенольних сполук у сировині та екстрактах листя журавлини великоплодої та болотної визначали методом прямої спектрофотометрії з вираженням результатів у перерахунку на галову кислоту [96].

Для аналізу сировини відбирали точну наважку подрібненого листа (350) масою 1,0 г, яку поміщали у колбу місткістю 200,0 мл та додавали 30 мл 50 % етанолу. Колбу з'єднували зі зворотним холодильником і проводили екстрагування на водяній бані протягом 15 хв. Процедуру екстракції повторювали ще двічі з використанням нових порцій розчинника. Отримані витяги об'єднували, охолоджували, фільтрували через паперовий фільтр у мірну колбу об'ємом 100,0 мл та доводили об'єм розчину 50 % етанолом до мітки.

Для аналізу екстрактів відбирали точну наважку екстракту 0,05 г, яку розчиняли при постійному перемішуванні у 10 мл 50 % етанолу. Розчинення проводили тричі з використанням нових порцій розчинника. Одержані розчини об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр та кількісно переносили у мірну колбу місткістю 50,0 мл, після чого доводили об'єм тим самим розчинником до позначки та ретельно перемішували.

Для спектрофотометричного визначення 1,0 мл отриманого розчину сировини або екстракту переносили у мірну колбу місткістю 25,0 мл та доводили об'єм 50 % етанолом до позначки. Із цього розчину відбирали 5,0 мл, переносили у другу мірну колбу об'ємом 25,0 мл і доводили до мітки тим самим розчинником. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали при довжині хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння 50 % етанолу.

Вміст суми фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту обчислювали у відсотках (2.2), використовуючи питомий показник поглинання галової кислоти, який становить 540:

$$X = \frac{A \cdot V_{\text{МК1}} \cdot V_{\text{МК2}} \cdot 100}{A_{\text{Г}} \cdot V_{\text{П1}} \cdot V_{\text{П2}} \cdot m_{\text{Н}} \cdot (100 - w)}, \quad (2.2)$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$m_{\text{Н}}$  – маса наважки листа або екстракту, г;

$A_{\Gamma}$  – питомий показник поглинання галової кислоти за довжини хвилі 270 нм (540);

$V_{mk1}$  – об'єм першої мірної колби, мл;

$V_{mk2}$  – об'єм другої мірної колби, мл;

$V_{n1}$  – об'єм першої піпетки, мл;

$V_{n2}$  – об'єм другої піпетки, мл;

$w$  – втрата в масі при висушуванні, %.

## 2.8 Методика кількісного визначення суми фенольних сполук методом Фоліна-Чокальтеу

Для кількісного визначення вмісту суми фенольних сполук в екстрактах листя журавлини великоплодої застосовували метод Фоліна-Чокальтеу [97].

Для аналізу використовували як рідкі, так і сухі екстракти. У разі дослідження рідких екстрактів для аналізу відбирали 1,0 мл екстракту, який переносили до мірної колби об'ємом 50,0 мл та доводили об'єм до мітки 50 % етанолом. Для сухих екстрактів відважували 0,05 г екстракту, розчиняли у 50 % етанолі в мірній колбі об'ємом 50,0 мл з доведенням до мітки та ретельним перемішуванням. Далі відбирали 1,0 мл отриманого розчину, який поміщали у мірну колбу на 50,0 мл та знову доводили об'єм тим самим розчинником.

До мірної колби об'ємом 25,0 мл додавали 1,0 мл приготовленого розчину для аналізу, 1,0 мл фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву, 10,0 мл очищеної води та доводили об'єм до позначки розчином карбонату натрію (290 г/л). Через 30 хв оптичну густину розчину вимірювали при довжині хвилі 765 нм. Як компенсаційний розчин використовували воду очищену.

Кількісний вміст суми фенольних сполук, у перерахунку на кислоту галову, ( $X$ , %) розраховували за формулою (2.3, 2.4):

$$\text{для рідких екстрактів: } X = \frac{C_x \cdot V_{mk1} \cdot V_{mk2} \cdot 100}{V_{n1} \cdot V_{n2} \cdot m_{cz}}, \quad (2.3)$$

для сухих екстрактів: 
$$X = \frac{C_x \cdot V_{mk1} \cdot V_{mk2} \cdot 100}{V_{п1} \cdot V_{п2} \cdot m_{ек}}, \quad (2.4)$$

де  $C_x$  – концентрація, взята з калібрувального графіка, г/мл;

$V_{mk1}$  – об'єм першої мірної колби, мл;

$V_{mk2}$  – об'єм другої мірної колби, мл;

$V_{п1}$  – об'єм першої піпетки, мл;

$V_{п2}$  – об'єм другої піпетки, мл;

$V_{ек}$  – об'єм екстракту для аналізу, мл;

$m_{сз}$  – маса екстракту, г;

$m_{ек}$  – маса екстракту, г.

## 2.9 Методика кількісного визначення суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид)

Аналітичну процедуру кількісного визначення суми флавоноїдів у листі журавлини болотної та великоплодої, а також в екстрактах листя журавлини великоплодої, виконували відповідно до вимог, регламентованих монографією ДФУ «Чорниці листя<sup>N</sup>» [98], з використанням спектрофотометричного методу та подальшим перерахунком результатів на гіперозид.

Для аналізу використовували точну наважку досліджуваного зразка масою 200 мг, яку переносили у круглодонну колбу місткістю 100 мл, після чого додавали 1 мл розчину гексаметилентетраміну концентрацією 5 г/л, 20 мл ацетону та 2 мл хлористоводневої кислоти. Отриману суміш нагрівали під зворотним холодильником упродовж 30 хв, після чого фільтрували через ватний тампон у колбу відповідного об'єму. Твердий залишок, що залишався у круглодонній колбі, піддавали повторній екстракції двічі з використанням по 20 мл ацетону, кожного разу здійснюючи нагрівання під зворотним холодильником протягом 10 хв. Після охолодження кожен екстракт фільтрували через ватний тампон і об'єднували з

основним фільтратом. Об'єднані ацетонові витяги додатково фільтрували через паперовий фільтр у мірну колбу та доводили об'єм розчину до 100 мл ацетоном. Частину одержаного розчину об'ємом 20,0 мл переносили у ділильну лійку, додавали 20 мл води та проводили рідинно-рідинну екстракцію, використовуючи спочатку 15 мл етилацетату, а далі три додаткові порції етилацетату по 10 мл кожна.

Органічні фази об'єднували, промивали двома порціями води по 50 мл, пропускали через 10 г безводного натрію сульфату у мірну колбу місткістю 50 мл та доводили об'єм етилацетатом до мітки. Для спектрофотометричного визначення 10,0 мл підготовленого розчину змішували з 1 мл розчину хлориду алюмінію та доводили об'єм до 25,0 мл 5 % розчином льодяної оцтової кислоти у метанолі; компенсаційний розчин готували шляхом розведення 10,0 мл вихідного розчину до 25,0 мл тим самим розчинником без додавання хлориду алюмінію. Оптичну густину випробовуваного розчину вимірювали через 30 хв після приготування відносно компенсаційного розчину за довжини хвилі 425 нм із використанням спектрофотометра Evolution 60S (США). Кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид визначали у відсотках із використанням питомого показника поглинання гіперозиду, що дорівнює 500, за формулою (2.5):

$$X = \frac{A \cdot 1,25}{m}, \quad (2.5)$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину за 425 нм;

1,25 – коефіцієнт, що враховує питомий показник поглинання гіперозиду та всі етапи розведення зразка;

$m$  – маса наважки досліджуваного зразка, г.

## 2.10 Методика кількісного визначення суми флавоноїдів (у перерахунку на рутин)

Визначення вмісту суми флавоноїдів в екстрактах листя журавлини великоплодої здійснювали методом диференціальної спектрофотометрії після реакції комплексоутворення з хлоридом алюмінію з подальшим перерахунком результатів на рутин [99]. Як стандартний зразок для кількісного визначення використовували рутин виробництва Sigma-Aldrich (серія № BCCG8099, кат. № R5143; США).

Для аналізу відбирали точну наважку екстракту масою близько 0,25 г, яку переносили у мірну колбу місткістю 25,0 мл, розчиняли у 50 % етанолі, доводили об'єм розчину до мітки тим самим розчинником та ретельно перемішували. Для рідких екстрактів, настоянок або настоїв для аналізу відбирали 1,0 мл зразка; попередньо визначали масу сухого залишку. Отримані розчини використовували як вихідні. Для утворення комплексу 1,0 мл вихідного розчину переносили у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, додавали 1,0 мл 2 % розчину хлориду алюмінію (III), приготовленого у 5 % розчині льодяної оцтової кислоти в метанолі, після чого доводили об'єм тим самим розчинником до мітки та ретельно перемішували. Через 30 хв вимірювали оптичну густину утвореного комплексу на спектрофотометрії Evolution 60S (США) за довжини хвилі 417 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували розчин, що містив 2,0 мл вихідного розчину екстракту, доведений у мірній колбі місткістю 25 мл до мітки 50 % етанолом.

Паралельно за аналогічних умов проводили визначення з використанням стандартного зразка рутину. Близько 0,01 г рутину (точна наважка) вносили у мірну колбу ємністю 25,0 мл, розчиняли у 50 % етанолі, доводили об'єм розчину до мітки та перемішували. Далі до 1,0 мл розчину стандартного зразка додавали 1,0 мл 3 % спиртового розчину хлориду алюмінію та доводили об'єм 50 % етанолом до 25,0 мл. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин обчислювали у відсотках за формулами (2.6):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_{MK1} \cdot V_{П0} \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_{1/сз} \cdot V_{MK0} \cdot V_{П1} \cdot (100-w)}, \quad (2.6)$$

де  $A_1$  – оптична густина комплексу екстракту з  $AlCl_3$ ;

$A_0$  – оптична густина комплексу стандарту рутину з  $AlCl_3$ ;

$m_{1/сз}$  – маса наважки сухого екстракту або маса сухого залишку, що відповідає взятому об'єму рідкого екстракту, г;

$m_0$  – маса стандартного зразка рутину, г;

$V_{MK0}$  – об'єм мірної колби для вихідного стандартного розчину рутину, мл;

$V_{MK1}$  – об'єм мірної колби для вихідного розчину екстракту, мл;

$V_{MK0}$  – аліквота стандартного розчину рутину, мл;

$V_{MK1}$  – аліквота вихідного розчину екстракту, мл;

$w$  – втрата в масі при висушуванні, %.

2.11 Методика кількісного визначення суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту

Кількісне визначення суми похідних гідроксикоричних кислот у листі журавлини та екстрактах з нього здійснювали спектрофотометричним методом із вираженням результатів у перерахунку на хлорогенову кислоту [100]. Як стандартний зразок використовували хлорогенову кислоту (кат. № 25700; Fluka Chemie AG, Швейцарія).

Для аналізу відважували точну наважку листя досліджуваного зразка масою 3,0 г, подрібненого до порошкоподібного стану з розміром частинок близько 350 мкм, яку переносили у колбу місткістю 250 мл. До зразка додавали 30 мл 50 % етанолу, після чого колбу з'єднували зі зворотним холодильником і проводили екстрагування на водяній бані протягом 15 хв. Процедуру екстракції повторювали тричі. Одержані витяги об'єднували, охолоджували та фільтрували через

складчастий паперовий фільтр типу «синя стрічка» у мірну колбу об'ємом 100 мл, після чого доводили об'єм розчину 50 % етанолом до мітки.

Точну наважку екстракту масою близько 0,1 г розчиняли у 5 мл 50 % етанолу, ретельно перемішуючи. Процедуру розчинення повторювали тричі, щоразу використовуючи свіжу порцію розчинника. Одержані розчини об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр і кількісно переносили у мірну колбу об'ємом 25,0 мл, після чого доводили об'єм тим самим розчинником до мітки та перемішували.

Для спектрофотометричного аналізу 1,0 мл отриманого досліджуваного розчину (екстракту з листя або розчиненого екстракту) переносили у мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводили об'єм 50 % етанолом до мітки та ретельно перемішували.

Стандартний розчин готували шляхом розчинення точної наважки хлорогенової кислоти масою 0,05 г у мірній колбі об'ємом 100 мл із використанням 50 % етанолу з подальшим доведенням об'єму до мітки. Із отриманого розчину відбирали 1,0 мл, переносили у мірну колбу об'ємом 50 мл, доводили об'єм тим самим розчинником до позначки та перемішували. Оптичну густину стандартного розчину визначали за аналогічних умов відносно 50 % етанолу.

Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Evolution 60S (США) за довжини хвилі 327 нм. Як розчин порівняння використовували 50 % етанол.

Кількість похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту у зразках обчислювали у відсотках за формулою (2.7):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot V_{\text{МК,ДЛ}} \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot V_{\text{МК,СТ}} \cdot (100 - w)}, \quad (2.7)$$

де  $A_1$  – оптична густина дослідного розчину екстракту;

$A_0$  – оптична густина стандартного розчину хлорогенової кислоти;

$m_1$  – маса наважки досліджуваного зразка, г;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразка хлорогенової кислоти, г;

$V_{mk,dl}$  – об'єм мірної колби для приготування дослідного розчину, мл;

$V_{mk,st}$  – об'єм мірної колби для приготування стандартного розчину, мл;

$w$  – втрата в масі при висушуванні, %.

2.12 Методика кількісного визначення суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту за питомим показником поглинання

Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот у екстрактах визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту, у відсотках [98].

Для аналізу використовували точну наважку екстракту масою 0,1 г (точна наважка). Наважку поміщали у колбу місткістю 100 мл з доведенням об'єму 50 % етанолом до позначки та ретельним перемішуванням. Одержаний розчин фільтрували крізь паперовий фільтр типу «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату.

Для приготування випробовуваного розчину 1,0 мл приготовленого розчину переносили у мірну колбу місткістю 10 мл та послідовно, з перемішуванням після кожного додавання, вносили 2,0 мл 0,5 М розчину хлористоводневої кислоти, 2,0 мл свіжоприготованого розчину, що містив 10 г натрію нітриту та 10 г натрію молібдату у 100 мл води, а також 2,0 мл розчину натрію гідроксиду. Після цього об'єм розчину доводили водою до позначки та ретельно перемішували.

Компенсаційний розчин готували аналогічно, використовуючи 1,0 мл вихідного розчину, до якого додавали 2,0 мл 0,5 М розчину хлористоводневої кислоти та 2,0 мл розчину натрію гідроксиду, після чого об'єм доводили водою до 10 мл і перемішували, не додаючи реактивів натрію нітриту та натрію молібдату.

Оптичну густина випробовуваного розчину вимірювали негайно після приготування за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною оптичного шару 10 мм, використовуючи компенсаційний розчин як розчин порівняння.

Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту обчислювали у відсотках за формулою (2.8):

$$X = \frac{A \cdot 1000}{188 \cdot m}, \quad (2.8)$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину при довжині хвилі 525 нм;  
 $m$  – маса наважки екстракту, г.

Для розрахунків використовували питомий показник поглинання хлорогенової кислоти, що дорівнює 188.

### 2.13 Методика аналізу фенольних сполук методом високоефективної рідинної хроматографії з фотодіодним матричним детектором

Перед проведенням хроматографічного аналізу екстракт з листя журавлини великоплодої, а також екстракти з додаванням амінокислот розчиняли у 70 % етанолі до повного розчинення з отриманням кінцевої концентрації 1 мг/мл, після чого фільтрували через шприцеві мембранні фільтри з полівініліденфториду з розміром пор 0,2 мкм (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Німеччина).

Якісний і кількісний аналіз фенольних сполук проводили методом високоефективної рідинної хроматографії з фотодіодно-матричним детектором на системі Waters e2695 Alliance HPLC-PDA (Waters, Milford, MA, США). Розділення компонентів здійснювали на зворотно-фазній колонці ACE Super C18 (250 × 4,6 мм, 3 мкм; АСТ, Aberdeen, Велика Британія) за температури колонки 35 °С відповідно до раніше описаної методики [101].

Рухому фазу подавали зі швидкістю 0,5 мл/хв, і вона складалася з 0,1 % трифтороцтової кислоти (елюент А) та ацетонітрилу (елюент В). Градієнт елюювання включав такі етапи: 90 % А (0 хв), 70 % А (0–40 хв), 30 % А (40–60 хв), 10 % А (60–64 хв) з подальшим поверненням до початкових умов (90 % А; 64–70 хв). Об'єм інжекції зразка становив 10 мкл.

Ідентифікацію фенольних сполук у екстрактах журавлини здійснювали на основі зіставлення часів утримування та УФ-спектрів поглинання з відповідними характеристиками комерційних стандартів. Реєстрацію хроматограм здійснювали з використанням фотодіодно-матричного детектора за вибраними довжинами хвиль залежно від класу фенольних сполук: 280 нм – для проантоціанідів і катехінів, 360 нм – для флавонолів та 520 нм – для антоціанів. Кількісне визначення компонентів проводили із застосуванням методу стандартних калібрувальних розведень, використовуючи лінійні регресійні моделі.

#### 2.14 Формування гелевих систем для напівтвердого екструзійного тривимірного друку зразків з екстрактами листя журавлини великоплодої

Для формування гелевих систем, придатних для SSE-3D-друку, використовували водні гелі поліетиленоксиду (PEO) із середньою молекулярною масою близько 900 000 (Sigma-Aldrich, США). Для отримання 12 % гелю 1,2 г PEO розчиняли у 10 мл дистильованої води шляхом витримування суміші при кімнатній температурі протягом 13–15 год до утворення однорідного в'язкого гелю [102, 103]. До сформованої гелевої матриці додавали 1,0 г екстракту листя журавлини великоплодої та поверхнево-активну речовину Eumulgin SMO 20 (поліетиленгліколь-40 гідрогенізованої касторової олії) у кількості 1,2 г для покращення вивільнення біологічно активних речовин із надрукованих зразків [104]. Гелі PEO, наповнені екстрактами журавлини, були безпосередньо надруковані за допомогою настільної системи SSE-3D-друку (System 30 M, Hyrel 3D, США). Температура друкарської пластини була встановлена на рівні 30 °C. Швидкість друкуючої головки (21 G) становила 0,5 мм/с. Загалом було надруковано 8 шарів для модельних решіток та 5 шарів для препаратів у формі круглих дисків. Для перевірки якості 3D-друку було розроблено модель решітки розміром 4 × 4 за допомогою програмного забезпечення Autodesk 3ds Max Design 2017 (Autodesk Inc., США). Круглі диски (діаметром 20 мм) було розроблено за допомогою програмного забезпечення FreeCAD (версія 0.19).

Реологічні властивості приготовлених гелевих систем визначали за допомогою реометра Physica MCR 101 (Anton Paar, Австрія) з використанням виміральної геометрії «конус–пластина». Дослідження проводили при температурі 21–25 °С у режимі обертального зсуву за різних швидкостей зсуву.

## 2.15 Методика дослідження антимікробної активності екстрактів

Антимікробну активність екстрактів із листя журавлини великоплодої оцінювали в умовах *in vitro* у лабораторії біохімії мікроорганізмів і поживних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова під науковим керівництвом канд. біол. наук Т. П. Осолодченко. Для проведення дослідження використовували стандартні референтні штами мікроорганізмів, що представляють різні таксономічні групи грампозитивних і грамнегативних бактерій: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Протигрибкову активність досліджуваних зразків визначали з використанням еталонного штаму *Candida albicans* ATCC 885-653. Зазначений комплекс тест-мікроорганізмів застосовується для первинної оцінки протимікробної дії біологічно активних речовин.

Мікробні суспензії готували з урахуванням стандартизованої концентрації клітин, яка відповідала 0,5 одиниці за шкалою МакФарланда. Контроль оптичної щільності здійснювали за допомогою денситометра Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema», Чехія) при довжині хвилі 540 нм. Процес приготування суспензій проводили відповідно до інструкції виробника обладнання та вимог інформаційного листа МОЗ України № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій» [105]. Для синхронізації росту культур застосовували метод охолодження при температурі 4 °С.

Визначення чутливості мікроорганізмів до досліджуваних екстрактів здійснювали агар-дифузійним методом (метод лунок) як модифікацію дифузійного підходу відповідно до рекомендацій Європейського комітету з визначення

чутливості до антимікробних препаратів (EUCAST) [106]. Дослідження проводили у поживному середовищі Мюллера–Хінтона (Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія), яке готували відповідно до інструкції виробника. Для аналізу чутливості грибів використовували сабуро-декстрозний агар.

Експеримент здійснювали на двошаровій поживній системі, яку формували безпосередньо в чашках Петрі. Нижній шар складався з 10 мл агар-агару. На його поверхню встановлювали від трьох до шести стерильних металевих циліндрів діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Після цього навколо циліндрів заливали верхній шар, який містив 14 мл агаризованого поживного середовища та 1 мл мікробної суспензії стандартної концентрації (0,5 за шкалою МакФарланда), приготовленої зі свіжої добової культури відповідного штаму. Після повного застигання агару циліндри видаляли стерильним інструментом, а в утворені лунки вносили по 0,3 мл досліджуваного зразка.

Як засіб порівняння використовували лікарський препарат «Інурек» (Farmasierra Manufacturing, Іспанія), до складу якого входить концентрований екстракт плодів журавлини американської в дозі 150 мг.

Оцінку антимікробної дії екстрактів проводили на підставі аналізу діаметра зон інгібування росту тест-мікроорганізмів: значення до 10 мм свідчили про відсутність чутливості, у межах 10–15 мм – про слабку, 15–25 мм – про помірну, тоді як перевищення 25 мм вказувало на високу чутливість до досліджуваних зразків.

Розрахунки статистичних показників здійснювали з використанням Microsoft Excel (2016, версія 16.0, Microsoft Corporation, США). Результати наведено у форматі середнього арифметичного значення зі стандартним відхиленням ( $\pm$  SD). Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Достовірність отриманих результатів визначали при рівні статистичної значущості 95 %, що відповідало значенню  $p \leq 0,05$ .

## 2.16 Методика визначення протизапальної активності екстракту на клітинних моделях шкіри *in vitro*

Експеримент виконували на базі Варшавського медичного університету під керівництвом професора кафедри фармацевтичної біології Себастьяна Граніци. Для аналізу протизапальної активності екстракту з листя журавлини великоплодої на клітинах шкіри людини (кератиноцитах і фібробластах) 180 мг сухого екстракту розчиняли в 1,0 мл ДМСО та фільтрували з використанням Microser Advance Centrifugal Devices with Omega Membrane 100K при відносному центробіжному прискоренні 5000 g упродовж 10 хв. Отриманий фільтрат переносили у Microser Advance Centrifugal Devices with Omega Membrane 30K і повторно центрифугували за аналогічних умов. Після цього розчин розподіляли по 400 мкл у мікропробірки та зберігали за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Дослідження проліферації клітин за допомогою SRB-аналізу.* Кератиноцити та фібробласти людини, отримані від компанії Lonza Group (Швейцарія), висівали у 96-лункові планшети в об'ємі 100 мкл/лунку. Після досягнення клітинами 80–100 % конфлюентності до них додавали 100 мкл розчинів екстракту листя журавлини великоплодої в концентраціях 7,8125–1000 мкг/мл, приготовлених у середовищі DMEM. Планшети інкубували протягом 72 год за умов  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  та 5 %  $\text{CO}_2$ .

Після завершення інкубації клітини фіксували 50 % охолодженою трихлороцтовою кислотою (50 мкл/лунку) протягом 1 год при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , після чого планшети п'ять разів промивали дистильованою водою та висушували на шейкері (DTS-2) при температурі  $36\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$  і швидкості 500 об/хв. У кожен лунку вносили 50 мкл 0,04 % розчину сульфородаміну В та інкубували 1 год за кімнатної температури. Надлишок барвника видаляли шляхом промивання 1 % оцтовою кислотою (не менше 4 разів), після чого планшети знову висушували. Для екстракції зв'язаного барвника до кожної лунки додавали 100 мкл 10 мМоль розчину трис(гідроксиметил)амінометану ( $\text{pH} = 10,5$ ) та інкубували на шейкері за кімнатної температури. Оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі

510 нм [107]. Результати подано як середнє значення трьох незалежних біологічних експериментів  $\pm$  стандартне відхилення (SD). Статистичну достовірність визначали за *t*-критерієм Стьюдента при рівні значущості  $p \leq 0,05$ .

*ІФА.* Готували клітинну суспензію, що містила 1 000 000 клітин, і вносили її у 24-лунковий планшет, додаючи по 600 мкл суспензії в кожен лунку. Після цього клітини інкубували 48 год за темп. 37 °С та 5 % CO<sub>2</sub>. Далі готували серійні розведення екстракту листя журавлини великоплодої (1,95–250 мкг/мл) у середовищі DMEM з ДМСО для забезпечення однакової кінцевої концентрації ДМСО в усіх лунках. Як контроль використовували розчин DMEM з ДМСО (300 мкл PBS до 1500 мкл ДМСО).

Після інкубації за допомогою аспіратора аспірували DMEM з кожної лунки, промивали PBS (600 мкл/лунку), додавали по 560 мкл/лунку чистого DMEM і по 20 мкл/лунку відповідних розведень екстракту. Планшет інкубували 3 год у інкубаторі. Далі клітини стимулювали сумішшю TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$ . Для приготування робочого розчину TNF- $\alpha$  10 мкл розчину TNF- $\alpha$  з концентрацією 100 мкл/мл додавали до 990 мкл PBS і ретельно перемішували, отримуючи розчин з концентрацією 1 мкл/мл. Аналогічним способом готували розчин IFN- $\gamma$ . Після цього 640 мкл PBS і 480 мкл розчинів TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  переносили у мікропробірку та перемішували. У результаті отримували розчин, у якому концентрація білків становила 0,3 мкл/мл. Далі по 20 мкл підготовленого розчину вносили в лунки планшета, за винятком трьох лунок, куди додавали PBS (негативний контроль). Таким чином, у лунці концентрація як TNF- $\alpha$ , так і IFN- $\gamma$  становила 0,01 мкл/мл. Після цього планшет інкубували 24 год у інкубаторі. По завершенні інкубації збирали супернатант (200 мкл/лунку) і переносили його на два 96-лункові планшети, накривали термопластиковою плівкою та зберігали при -20 °С.

Набори для імуноферментного аналізу інтерлейкінів-6 та -8 були отримані від BD Biosciences (США). За день до проведення експерименту концентрат промивного буфера (ПБ) готували, додаючи 100 мл ПБ до 1900 мл дистильованої води, після чого фільтрували через компрес. Далі готували розчин, додаючи 48 мкл «capture»-антитіла до ІЛ-6 до 12 мл Coating Buffer і по 100 мкл суміші вносили в

кожну лунку 96-лункового планшета MaxiSorp. Аналогічно готували розчин «capture»-антитіла до ІЛ-8 і наносили його на другий планшет MaxiSorp (96 лунок). Планшети накривали термопластиковою плівкою і залишали в холодильнику приблизно на 24 год за температури 4 °С.

*Перша частина ІФА.* Планшети з супернатантами виймали з морозильної камери та розморожували на шейкері приблизно 30 хв за темп. 20 °С. Паралельно промивач BioTeck ELx50 промивали дистильованою водою та перевіряли роботу приладу. Після нічної інкубації планшети MaxiSorp (для ІЛ-6 та ІЛ-8) виймали з холодильника і промивали ПБ тричі (300 мкл/лунку). Далі в кожну лунку додавали по 200 мкл розчинника для зразків (РЗ) і інкубували 1 год за кімнатної температури.

*Друга частина ІФА.* Під час інкубації готували стандарти. Згідно з інструкцією набору, максимальна концентрація стандарту ІЛ-8 становила 200 пг/мкл, а ІЛ-6 – 300 пг/мкл. Стандартний розчин ІЛ-8 (200 пг/мкл) готували додаванням 20 мкл рекомбінантного людського ІЛ-8 (270 мкг/мл) до 27 мл РЗ. Стандартний розчин ІЛ-6 (300 пг/мкл) готували додаванням 20 мкл рекомбінантного людського ІЛ-6 з концентрацією 205 мкг/мкл до 13,70 мл РЗ. Інші стандарти отримували методом серійних розведень: 300 мкл попереднього стандарту переносили в наступну пробірку, що містила 300 мкл РЗ. Таким чином, отримували стандарти ІЛ-8 з концентраціями 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,3; 3,7 пг/мкл та стандарти ІЛ-6 з концентраціями 300; 150; 75; 2,5; 18,8; 9,4; 4,7 пг/мкл.

Далі готували розведення зразків: брали два чисті 96-лункові планшети та позначали їх як «ІЛ-6» і «ІЛ-8». До планшета «ІЛ-6» додавали 180 мкл/лунку РЗ і 20 мкл супернатанту, отримуючи розведення 1:10. До планшета «ІЛ-8» додавали 180 мкл/лунку РЗ і 20 мкл рідини з планшета «ІЛ-6», отримуючи розведення 1:100.

Після завершення інкубації планшетів MaxiSorp їх промивали ПБ тричі та вносили по 100 мкл/лунку всіх підготовлених розведень, накривали й інкубували в темному місці 2 год.

*Третя частина ІФА.* Після інкубації планшети промивали ПБ п'ять разів. Під час промивання готували робочий детектор: до 12 мл РЗ додавали 48 мкл детекторного антитіла до ІЛ-6 та 48 мкл ферменту (Sav-HRP). Аналогічно готували

детекторний розчин для ІЛ-8. Отримані детекторні розчини вносили у відповідні планшети по 100 мкл/лунку, накривали та інкубували в темряві 1 год.

*Четверта частина ІФА.* Планшети промивали ПБ сім разів і додавали по 100 мкл/лунку субстратного розчину (12 мл субстрату А + 12 мл субстрату В). Після цього інкубували в темряві 30 хв, додавали по 50 мкл стоп-розчину та перемішували на шейкері до отримання рівномірного жовтого забарвлення. Поглинання вимірювали при 570 нм з інтервалом не більше 30 хв між додаванням стоп-розчину та зчитуванням.

Отримані дані представлено як середнє значення з трьох незалежних біологічних повторів зі стандартним відхиленням. Оцінку статистичної достовірності проводили із застосуванням *t*-критерію Стьюдента, вважаючи відмінності значущими при  $p \leq 0,05$ .

## 2.17 Методика дослідження протизапальної активності на моделі карагенін-індукованого набряку

Експериментальну оцінку протизапальної дії сухого екстракту з листя журавлини великоплодої та модифікованого аргініном екстракту проводили на статевозрілих білих щурах масою 180–220 г, яких перед початком експерименту було розподілено на чотири групи по п'ять тварин [108]. Усі маніпуляції виконували відповідно до вимог Європейської конвенції щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами та норм Національного конгресу з біоетики [109, 110].

Екстракти вводили перорально за допомогою внутрішньошлункового зонда у вигляді водних розчинів у дозуванні 100 мг/кг за одну годину до моделювання запалення. Для порівняння фармакологічної активності застосовували референтний препарат – диклофенак натрію, неселективний інгібітор циклооксигенази, який вводили у дозі 8 мг/кг. Тваринам контрольної патології замість активної речовини вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

Асептичне запалення ініціювали шляхом субплантарного введення у задню кінцівку щура 1 % розчину карагеніну (0,1 мл), що здійснювали через 60 хв після введення досліджуваних речовин та еталонного препарату.

Показник об'єму лапи визначали плетизмометричним методом (прилад Panlab, Іспанія) до початку експерименту та через 1, 2, 3 і 4 год після індукції запалення. Ефективність екстрактів оцінювали за ступенем пригнічення карагенін-індукованого набряку порівняно з контрольною патологічною групою.

Антиексудативний ефект обчислювали за формулою (2.9):

$$AA = 100\% - \left( \frac{(V_{нд} - V_{зд}) \cdot 100}{(V_{нк} - V_{зк})} \right), \quad (2.9)$$

де  $AA$  – рівень пригнічення ексудації, у %;

$V_{нд}$  – пересічний об'єм набрякової лапи у дослідній групі, у мл;

$V_{зд}$  – пересічний об'єм здорової лапи у дослідній групі, у мл;

$V_{нк}$  – пересічний об'єм набряклої лапи у контрольній групі, у мл;

$V_{зк}$  – пересічний об'єм здорової лапи у контрольній групі, у мл.

Отримані результати подано у вигляді середнього значення та стандартної похибки ( $\pm$  SD). Статистичну достовірність відмінностей визначали за  $t$ -критерієм Стьюдента, вважаючи їх значущими при  $p \leq 0,05$ .

## 2.18 Методика дослідження гострої токсичності

Оцінку гострої токсичності проводили на білих безпородних мишах обох статей масою тіла 18–22 г, яких утримували у віварії Івано-Франківського національного медичного університету на стандартному раціоні [108, 111]. Тварин розподіляли на експериментальні групи по 6 особин у кожній.

Сухий екстракт з листя журавлини великоплодої вводили мишам внутрішньошлунково у дозі 5000 мг/кг у вигляді водного розчину за допомогою

металевого зонда. Окремо формували контрольну групу, тварини якої отримували відповідний об'єм розчинника.

Після введення досліджуваних зразків за тваринами спостерігали протягом 14 діб. Оцінку токсичної дії проводили за інтегральними показниками загального стану (рівень рухової активності, положення тіла, стан шкірних покривів, слизових оболонок, температура тіла), а також за наявністю окремих симптомів, зокрема тремору, судом, діареї, сонливості чи інших ознак порушення фізіологічних функцій.

## 2.19 Методика дослідження гепатопротекторної активності

Вивчення гепатопротекторної активності сухих екстрактів з листя та їх амінокислотних композицій проводили на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту, яка є однією з найбільш відтворюваних токсикологічних моделей у доклінічній фармакології. Експериментальну частину роботи виконували на базі Клініко-біологічної експериментальної лабораторії Івано-Франківського національного медичного університету (ІФНМУ), обладнаної згідно з чинними «Санітарними правилами щодо улаштування, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)». Усі маніпуляції проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом з біоетики [111], а також у відповідності до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [110]. Експериментальний протокол затверджено Комісією з етики ІФНМУ (протокол № 133/23 від 29.03.2023).

У дослідженні використовували 66 статевозрілих білих нелінійних щурів масою 160–240 г, стандартизованих за фізіологічними та біохімічними показниками. Тварин утримували за температури 18–20 °С, відносній вологості 50–55 %, за стандартного світлового режиму та повнораціонного харчування. Щурів поділяли на 11 груп по шість тварин: інтактну; контрольної патології (CCl<sub>4</sub>); вісім

груп, які отримували сухий екстракт листя журавлини та його композиції з валіном, аргініном, аланіном, гліцином, гістидином, аспарагіноювою кислотою та таурином у дозі 25 мг/кг; та групу порівняння, яка отримувала препарат «Силібор» (Здоров'я, Україна) у дозі 25 мг/кг.

Гостре токсичне ураження печінки викликали шляхом дворазового внутрішньоочеревинного введення 50 % олійного розчину тетрахлорметану в дозі 0,8 мл/100 г маси тіла з інтервалом 24 год. Такий підхід забезпечує розвиток вираженого цитолітичного синдрому та оксидативного стресу, що відповідає класичній методиці моделювання гепатиту, спричиненого галогенованими вуглеводнями [112]. Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково у вигляді водних розчинів; таблетки «Силібор» перед застосуванням очищали від оболонки та суспендували у 1% крохмальному розчині. Інтактні тварини отримували очищену воду. Застосування екстрактів проводили через 1 та 2 год після введення токсиканта.

На третю добу після першої ін'єкції  $CCl_4$  тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Після евтаназії проводили забір крові для одержання сироватки та вилучення печінки для морфофункціонального аналізу. КМП визначали як відсоткове співвідношення маси органу до маси тіла тварини. Активність АлАТ та АсАТ, які є чутливими маркерами цитолізу гепатоцитів, визначали методом Рейтмана–Френкеля з використанням реактивів «SIMKO Ltd.» (Дніпро, Україна) [113].

Рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів, що реагують із 2-тіобарбітуровою кислотою, визначали спектрофотометричним методом за Є. Н. Коробейніковою із застосуванням наборів «Фелісіт-Діагностика» (Україна) окремо у сироватці та гомогенатах печінки [114]. Біохімічні аналізи виконували в акредитованій лабораторії Центру біоелементології ІФНМУ (сертифікат технічної компетентності № 037/19 від 13.06.2019 до 12.06.2024).

Статистичний аналіз проводили методом варіаційної статистики з використанням  $t$ -критерію Стьюдента; відмінності вважали статистично значущими при  $p \leq 0,05$ . Ефективність гепатопротекторної дії оцінювали за

нормалізацією ферментативних показників, зниженням інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та зменшенням коефіцієнта маси печінки порівняно з групою контрольної патології.

## 2.20 Методика дослідження гіпоглікемічної активності

Для проведення досліджень *in vivo* використовували тримісячних самців безпородних білих щурів, маса тіла яких становила  $190 \pm 10$  г. Тварини утримувалися у віварії Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету (Харків, Україна) під керівництвом доцента Кравченко Ганни Борисівни. Усі маніпуляції з тваринами відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових цілей» [110], Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [115] та Директиви 2010/63/EU [116]. Протокол експерименту був схвалений Комісією з етики НФаУ (Протокол № 3 від 10.09.2020; рішення № 3/10092020).

Протягом експерименту тварин утримували на базовому раціоні, при цьому щури інтактної групи мали постійний доступ до питної води. Формування інсулінорезистентності здійснювали шляхом тривалого (5 тижнів) перорального введення 20 % розчину фруктози без обмеження споживання, що відповідає загальноприйнятим підходам до моделювання метаболічних порушень [100, 117].

Для фармакологічного контролю використовували референтні засоби з відомим гіпоглікемічним профілем – «Метформін-Тева» (Teva, Чехія) та рослинний комбінований препарат «Арфазетин» (Ліктрави, Україна).

Після завершення етапу індукції інсулінорезистентності тварин рандомізували на сім експериментальних груп по 6 особин у кожній:

1. ІТ – інтактні тварини;
2. ІР – індукована інсулінорезистентність без лікування;
3. ІР + Е – ІР + внутрішньошлункове введення екстракту з листя журавлини (Е) у дозі 200 мг/кг протягом останніх 2 тижнів експерименту;

4. IP + E + Аргінін – IP + комбіноване введення E разом із аргініном у тій же схемі (200 мг/кг);
5. IP + Аргінін – IP + внутрішньошлункове введення аргініну у дозі 100 мг/кг;
6. IP + Арфазетин – IP + прийом настою фітозбору «Арфазетин» (18 мл/кг);
7. IP + Метформін – IP + метформін у дозі 100 мг/кг за аналогічною схемою.

Стан інсулінової чутливості та перебіг метаболічних порушень оцінювали з використанням комплексу функціональних тестів, що включав ОГТТ, ІТТ та розрахунок індексу НОМА-IR. ОГТТ проводили наприкінці сьомого тижня експерименту після попереднього 12-годинного харчового обмеження [118]. Забір капілярної крові здійснювали шляхом мікроінцизії ясен, після чого концентрацію глюкози визначали за допомогою портативного глюкометра «One Touch Select» (LifeScan, США). Базальний рівень глікемії фіксували безпосередньо перед навантаженням (0 хв), після чого тваринам внутрішньошлунково вводили водний розчин глюкози у дозі 3 г/кг маси тіла («Істок-Плюс», Україна). Подальшу динаміку глікемії реєстрували через 30, 60, 90 та 120 хв після глюкозного навантаження. Інтегральну оцінку змін рівня глюкози в крові здійснювали шляхом розрахунку площі під глікемічною кривою, яку визначали за трапецієподібним алгоритмом [119, 120]. Через 48 год після завершення перорального глюкозотолерантного тесту проводили тест толерантності до інсуліну (ІТТ). Чутливість до інсуліну оцінювали за швидкістю та ступенем зниження глікемії протягом 120 хв з інтервалом вимірювань 30 хв після внутрішньочеревного введення людського інсуліну (Novo Nordisk, Данія) у дозі 1 ОД/кг.

Після завершення сьомого тижня експерименту та 12-годинного періоду харчової депривації тварин виводили з досліду під кетаміновим наркозом (Biovit Pulawy, Польща). Евтаназію здійснювали методом декапітації з подальшим забором крові для отримання сироватки. Ізольовану печінку обробляли охолодженим ізотонічним розчином хлориду натрію, після чого з тканини готували

10 % гомогенати в трис(гідроксиметил)амінометан-гідрохлоридному буфері (10 мМ, рН 7,4) для подальших біохімічних досліджень.

Концентрацію глюкози натще та рівень імунореактивного інсуліну визначали з використанням стандартизованих комерційних діагностичних наборів («Фелісіт-Діагностика», Україна; «DRG», Німеччина). Індекс НОМА розраховували за формулою (2.10):

$$X = \frac{(I_0 \times \Gamma_0)}{22,5}, \quad (2.10)$$

де  $I_0$  — інсулін натще, мкОд/мл;

$\Gamma_0$  — глюкоза натще, ммоль/л;

22,5 — постійний коефіцієнт-перетворювач, що стандартизує одиниці глюкози та інсуліну.

Для оцінки показників ліпідного обміну в сироватці крові визначали рівні триацилгліцеролів, загального холестеролу, а також холестеролу ліпопротеїнів високої та низької щільності з використанням стандартних діагностичних наборів «Фелісіт-Діагностика» (Україна). У печінковій тканині аналізували вміст нейтральних і полярних ліпідів, зокрема триацилгліцеролів, діацилгліцеролів, загальних фосфоліпідів, холестеролу та вільних жирних кислот. Виділення ліпідної фракції здійснювали шляхом екстракції органічними розчинниками за класичною методикою Фолча. Отриману хлороформну фазу упарювали в потоці інертного газу за температури 37 °С, після чого сухий залишок ресуспендували у суміші хлороформ–метанол (1:2). Розділення ліпідних фракцій проводили методом тонкошарової хроматографії з використанням рухомої фази гексан–діетиловий ефір–оцтова кислота у співвідношенні 80:20:2 (об/об). Після хроматографічного розділення відповідні зони адсорбенту вилучали та кількісно визначали вміст ліпідів методом термічного обвуглення за Маршем і Вайнштейна [121].

Концентрацію білка визначали модифікованим методом Лоурі у варіанті Міллера [122].

Довірчий інтервал обчислювали на рівні значущості 95 % з використанням критерію Стюдента. Результати подано у вигляді середнього значення та стандартного відхилення. Статистично значущими вважали відмінності за рівнями  $p \leq 0,05$ .

## 2.21 Методика визначення мікробіологічної чистоти екстрактів

Мікробіологічну чистоту екстрактів рослинного походження визначали з урахуванням можливості мікробної контамінації фітохімічних засобів. Дослідження проводили відповідно до вимог ДФУ 2.1 (п. 2.6.12, 2.6.13) [93].

Для визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів 10 г екстракту поміщали у стерильну мірну ємність та доводили об'єм до 500 мл стерильною нейтралізуючою рідиною, що містила полісорбат-80 у концентрації 10 % та ізопропілмірикат у концентрації 20 %. Отриману суспензію ретельно перемішували, після чого по 1 мл підготовленого зразка висівали двошаровим методом на кожному з п'яти чашок Петрі з щільним живильним середовищем № 1.

Для визначення загальної кількості життєздатних грибів використовували аналогічну схему підготовки зразка. По 1 мл підготовленої суспензії висівали двошаровим методом на щільне живильне середовище № 2 у п'ять чашок Петрі.

Випробування на наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій, а також *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* проводили після попереднього розведення 10 г екстракту у 500 мл стерильної нейтралізуючої рідини з полісорбатом-80 та ізопропілмірикатом. Для аналізу 50 мл підготовленого зразка вносили у 500 мл відповідних живильних середовищ № 3 та № 8.

Оцінку результатів випробувань здійснювали відповідно до критеріїв мікробіологічної чистоти, установлених ДФУ (п. 5.1.4, категорія 2) [93].

### РОЗДІЛ 3

## ФАРМАКОГНОСТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЛИСТЯ ТА ПАГОНІВ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ ТА БОЛОТНОЇ

У межах цього дослідження листя та пагони журавлини великоплодої і журавлини болотної обрано як об'єкти фармакогностичного аналізу для встановлення їх анатомо-діагностичних ознак та оцінки хімічного складу. За даними літератури, біологічна активність представників роду *Vaccinium* пов'язується насамперед із вмістом фенольних сполук, однак більшість досліджень зосереджена на фітохімічній характеристиці плодів, тоді як вегетативні органи залишаються недостатньо вивченими [123, 124].

Водночас результати досліджень інших видів роду *Vaccinium* свідчать про фармакологічну перспективність листя як джерела фенольних антиоксидантів, що обґрунтовує доцільність фармакогностичного дослідження листя та пагонів журавлини [125].

У цьому розділі наведено результати макро- та мікроскопічного аналізу листя і пагонів журавлини, дослідження порошкоподібної сировини, визначення елементного складу, а також якісну та кількісну оцінку основних груп біологічно активних речовин із використанням методів ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометрії. Отримані дані слугували науковим підґрунтям для подальшого фітохімічного та фармакологічного вивчення екстрактів листя журавлини.

### 3.1 Макроскопічний аналіз сировини

Макроскопічний аналіз проводили для вивчення морфологічних ознак листя та пагонів журавлини великоплодої і журавлини болотної (методика – розд. 2, п. 2.2). У досліджуваних зразках надземна частина представлена здерев'янілими сланкими та висхідними пагонами з характерною морфологічною будовою.

Плагіотропні (горизонтальні) пагони журавлини великоплодої досягають 7,0–42,0 см завдовжки та 0,15–0,20 см у діаметрі, тоді як ортотропні (висхідні)

пагони мають довжину 3,0–25,0 см і діаметр до 0,1 см. Поверхня горизонтальних пагонів вкрита темно-коричневою перидермою, часто з поздовжніми зморшками, тоді як висхідні пагони характеризуються світло-коричневим або коричневим забарвленням перидерми. Листкорозташування почергове, міжвузля короткі – у межах 0,3–0,9 см (рис. 3.1).



Рис. 3.1 Макроскопічний вигляд пагонів журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh). Фото: Власова І. К.

Листки прості, короткочерешкові, з цільною шкірястою листковою пластинкою. Верхній бік листка блискучий, забарвлений у темно-зелений, буро-зелений або коричневий колір, тоді як нижній бік має сизувато-зелений або світло-коричневий відтінок. За формою листкова пластинка варіює від вузько- до широкоовальної, рідше округлої або яйцеподібної; її ширина становить 0,3–0,6 см

(рис. 3.2, 2), довжина – 0,8–1,8 см (рис. 3.2, 3). Верхівка та основа листка округлі, край цілісний, злегка загнутий донизу.

Жилкування перисте: з верхнього боку добре помітні головна та бічні жилки, тоді як з нижнього боку чітко виражена головна жилка, а бічні спостерігаються рідше (рис. 3.2).



Рис. 3.2 Макроскопічні ознаки листя журавлини великоплодої (*Oxyrossis macrocarpus* (Aiton) Pursh): 1 – загальний вигляд (суміш листя); 2 – варіації ширини листкової пластинки; 3 – варіації довжини листкової пластинки. Фото: Власова І. К.

Журавлина болотна характеризується низкою макроскопічних особливостей, що дозволяють відрізнити її від журавлини великоплодої. У складі досліджуваної сировини переважають фрагменти здерев'янілих пагонів двох типів: сланких, або горизонтальних, завдовжки 7,0–12,0 см і діаметром до 0,1 см, а також висхідних пагонів завдовжки 4,0–23,0 см при аналогічному діаметрі (рис. 3.3). Поверхня пагонів світло-коричневого кольору; перидерма тонка, легко відшаровується у вигляді вузьких смужок. Листки розміщені почергово, міжвузля короткі, довжиною 0,4–1,2 см.



Рис. 3.3 Макроскопічний вигляд пагонів журавлини болотної (*Oxycoccus palustris* Pers.). Фото: Власова І. К.

Листки журавлини болотної прості, розміщені на коротких черешках (рис. 3.4). Листкова пластинка шкіряста, з вираженим блиском на верхньому боці, який зазвичай має зелений колір; зрідка трапляються поодинокі листки з буро-зеленим відтінком. Нижній бік листка сизувато-зелений або майже білий, що зумовлено наявністю воскового шару. За формою листкова пластинка переважно вузькоовальна або ланцетна, її ширина становить 0,2–0,5 см (рис. 3.4, 2), а довжина – 0,6–1,3 см (рис. 3.4, 3). Верхівка листка загострена або гостра, основа округла; край пластинки цілісний, злегка загнутий донизу. Жилкування перисте, при цьому головна та бічні жилки добре проглядаються з обох боків листкової пластинки.



Рис. 3.4 Макроскопічні ознаки листя журавлини болотної (*Oxycoccus palustris* Pers.): 1 – загальний вигляд (суміш листя); 2 – варіації ширини листкової пластинки; 3 – варіації довжини листкової пластинки. Фото: Власова І. К.

Таким чином, наведені макроскопічні ознаки дозволяють охарактеризувати листя та пагони журавлини великоплодої і журавлини болотної та слугують підґрунтям для подальшого мікроскопічного аналізу сировини [126].

### 3.2 Мікроскопічний аналіз сировини

Для уточнення анатомічних особливостей сировини після макроскопічного аналізу проведено мікроскопічне дослідження відповідно до методики, наведеної в розд. 2, п. 2.2.

Під час мікроскопічного дослідження сировини встановлено, що верхівкова частина горизонтального стебла журавлини великоплодої (рис. 3.5) не зазнала здерев'яніння і на поперечному зрізі має трикутні обриси із заокругленими кутами.

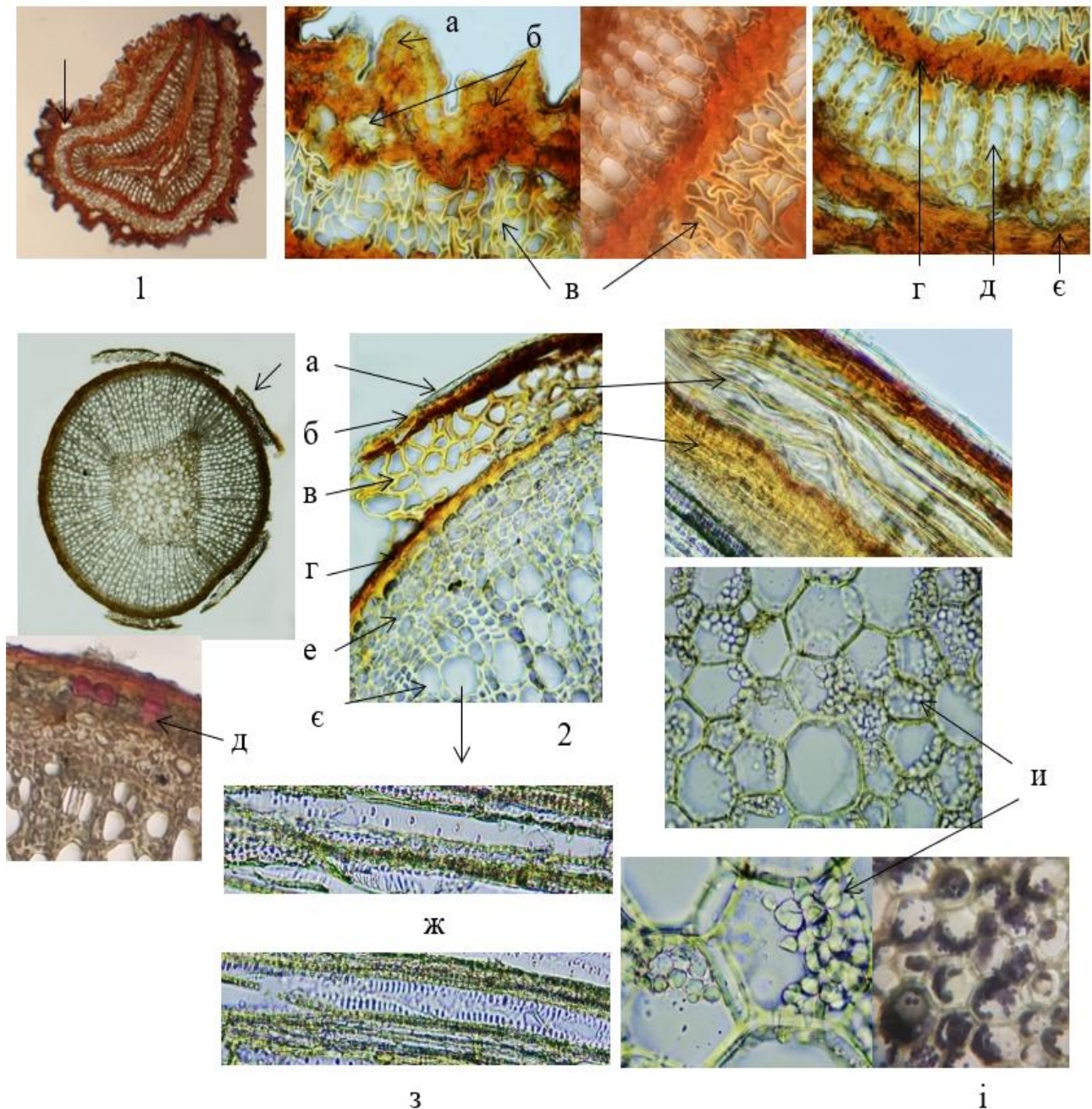


Рис. 3.5 Мікроскопічні ознаки горизонтального стебла журавлини великоплодої: 1 – *верхівкова частина*: а – епідерма з кутинізованими оболонками; б – кора паренхіма з порожнинами; в – кільце механічних елементів; г – флоема; д – ксилема; е – серцевина; 2 – *середня частина*: а – епідерма; б – зона первинної кори; в – кільце механічних елементів на поперечному і повздовжньому розрізах; г – перидерма; д – фелодерма з антоціаном; е – флоема; е – ксилема; ж – пористі судини на поздовжньому розрізі; з – драбинчасті судини; и – крохмальні зерна в клітинах серцевини; і – реакція крохмалю з розчином Люголя. Мікрофото: Власова І. К. та проф. Гонтова Т. М. [131]

Поверхня стебла характеризується вираженою нерівномірною горбкуватістю (рис. 3.5, 1, а) та вкрита епідермою з добре сформованим кутикулярним шаром. Клітини епідерми стиснуті, з нерівномірно потовщеними оболонками та коричневим вмістом.

Під епідермою розташована первинна кора, утворена паренхімними клітинами, які здавлені з боків, мають потовщені коричневі оболонки та заповнені однорідною речовиною (рис. 3.5, 1, б). У межах первинної кори спостерігаються округлі міжклітинні порожнини. Осьовий циліндр має безпучковий тип будови. Зовнішню його частину формує добре виражене кільце механічної тканини, представлене 3–5 шарами широкопросвітних, нерівномірно деформованих клітин (рис. 3.5, 1, в). Під механічним кільцем розміщується флоема, що утворює суцільний пояс із 2–3 шарів клітин з коричневим вмістом (рис. 3.5, 1, г).

Ксилема представлена переважно провідними елементами – пористими та драбинчастими судинами, які незначно різняться за діаметром. Судини розміщені радіально та чергуються з однорядними серцевинними променями (рис. 3.5, 1, д). Серцевина значно стиснута, складається з деформованих клітин, заповнених коричневим секретом (рис. 3.5, 1, е).

У середній частині горизонтального стебла поперечний зріз набуває округлих обрисів. Покривна система представлена шаром тканин, що місцями злущуються. До її складу входять тонка епідерма з кутинізованими оболонками (рис. 3.5, 2, а), вузька гомогенна зона первинної кори коричневого забарвлення (рис. 3.5, 2, б), а також кільце щільно розташованих широкопросвітних механічних волокон (рис. 3.5, 2, в), які на поперечному зрізі мають багатокутну або овальну форму.

Нижче формується тонка перидерма, що безпосередньо межує з флоемою (рис. 3.5, 2, г). Фелоген має протофлоемне походження, що є характерним для окремих представників родини Вересові [127]. Клітини корку містять щільний однорідний коричневий вміст, тоді як клітини фелодерми з антоціанами (рис. 3.5, 2, д). Флоемна зона вузька (рис. 3.5, 2, е), утворена клітинами зі слабо потовщеними оболонками; ситоподібні трубки мають невеликий діаметр.

Ксилемне кільце добре розвинене (рис. 3.5, 2, є), домінують судини приблизно однакового діаметра, які розташовані переважно в однорядних променях і чергуються з одно- та дворядними серцевинними променями. Тип судин – пористий і драбинчастий (рис. 3.5, 2, ж, з). Лібриформ у первинній ксилемі практично відсутній.

Ділянки первинної ксилеми, розташовані навпроти кутів серцевини, мають більш інтенсивне забарвлення, що зумовлено доцентрованим розміщенням судинних променів. Серцевина добре розвинена, у поперечному зрізі має 4–5-кутову форму; її клітини паренхімні, різні за розмірами, зі слабо потовщеними оболонками та прямими порами, містять крохмаль (рис. 3.5, 2, и). Крохмальні зерна дрібні, прості та складні; при взаємодії з розчином Люголя набувають темно-синього забарвлення (рис. 3.5, 2, і). Складні зерна утворені 2–4 простими та часто розпадаються.

За сукупністю анатомічних ознак висхідного стебла журавлини великоплодої в цілому подібні до горизонтального стебла, що узгоджується з літературними даними щодо представників роду *Vaccinium* [128, 129]. Водночас у їхній будові виявляється низка характерних особливостей.

У верхівковій частині висхідного стебла поперечний зріз має загалом округлі обриси, проте контури є значно хвилястими (рис. 3.6, 1, 2). В епідермі спостерігаються поодинокі прості криючі волоски гачкоподібної форми (рис. 3.6, 3). Клітини корової паренхіми містять великі друзи (рис. 3.6, В). Тип будови осевого циліндра має перехідний характер. Ксилема розвинена слабше, ніж у горизонтального стебла; у її зоні виявляється значна кількість великих порожнин (рис. 3.6, 1, 2, А). Серцевина округла, добре сформована, крохмаль у її клітинах не виявляється.

У середній частині висхідного стебла під перидермою (рис. 3.6, А) розташовується кільце товстостінних елементів флоєми, клітини яких значно варіюють за розмірами та мають рівномірно потовщені оболонки; між ними трапляються поодинокі порожнини невеликого діаметра (рис. 3.6, Б). Флоємна зона на межі з камбієм має характерне коричневе забарвлення (рис. 3.6, В), зумовлене

вмістом клітин та пігментацією їхніх оболонок. У ксилемі більш виражений розвиток лібриформу, унаслідок чого чітко радіальне розташування судин не простежується; судини різняться між собою за діаметром.

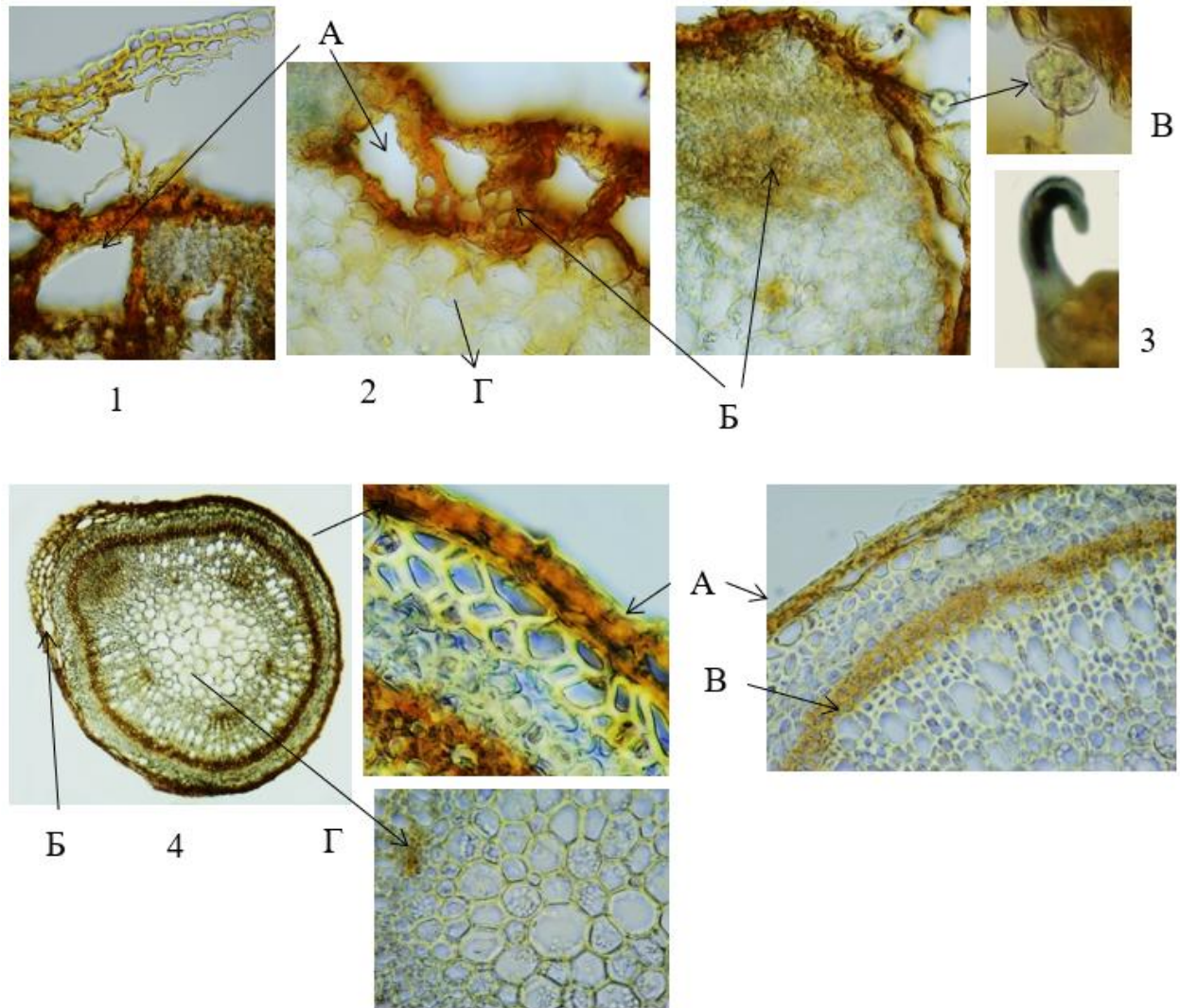


Рис. 3.6 Мікроскопічні ознаки бічного висхідного стебла журавлини великоплодої: 1 – верхівкова частина, на м/з 2 – верхівкова частина, на в/з: А – порожнини, Б – ксилема; В – друза, Г – клітини серцевини, 3 – простий гачкоподібний волосок, 4 – середня частина стебла: А – перидерма; Б – порожнина; В – кільце флоєми з коричневим вмістом; Г – серцевина з крохмальними зернами. Мікрофото: Власова І. К. та проф. Гонтова Т. М. [131]

За результатами мікроскопічного дослідження виявлено, що анатомічна будова горизонтального і висхідного стебла журавлини болотної у верхівковій та середній частинах загалом є близькою до будови стебла журавлини великоплодої (рис. 3.7, 1–2).

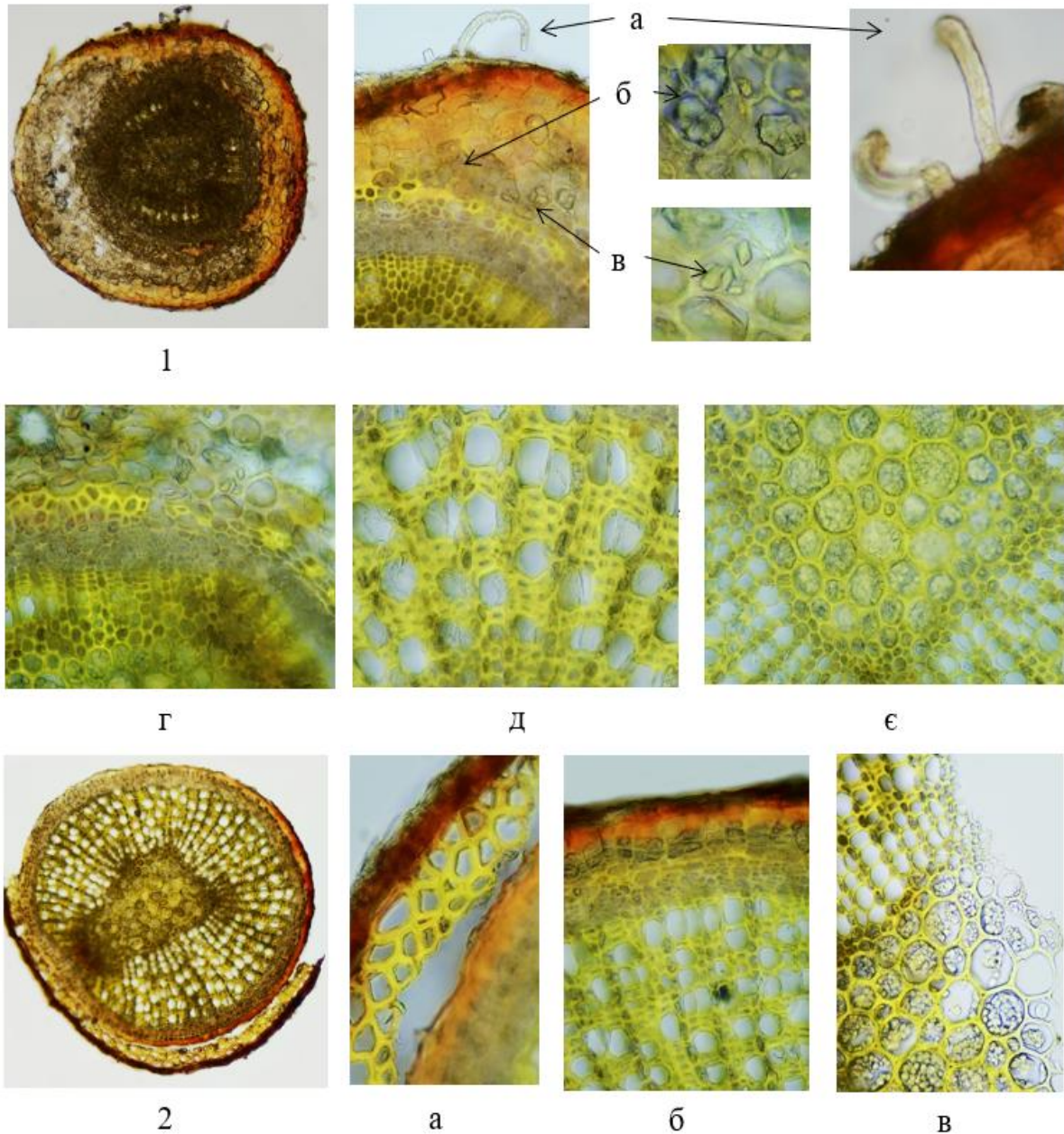


Рис. 3.7 Мікроскопічні ознаки стебла журавлини болотної: 1 – *верхівка висхідного стебла*: а – прості криючі трихоми; б – друзи; в – призматичні кристали; г – флоема; д – судини ксилеми; е – серцевина з крохмальними зернами; 2 – *середня частина горизонтального стебла*: а – перидерма; б – фрагмент ксилеми; в – серцевина з крохмальними зернами. Мікрофото: Власова І. К. та проф. Гонтова Т. М. [131]

Верхівкова частина висхідного стебла вкрита епідермальним шаром, у якому трапляються прості криючі трихоми з округлою верхівкою, прямі або загнуті у напрямку поверхні органа (рис. 3.7, 1–2, а). У клітинах корової паренхіми виявляються великі друзи, а також поодинокі призматичні кристали кальцію оксалату (рис. 3.7, 2, б, в). Судини ксилеми оточені добре розвиненими ділянками лібриформу, що надає провідній тканині більш щільної будови.

У процесі мікроскопічного дослідження листка журавлини великоплодої відзначено, що черешок у поперечному перерізі має переважно овальні обриси (рис. 3.8, 1). Його адаксіальна сторона дещо сплюснена і характеризується слабкою хвилястістю, тоді як абаксіальна поверхня є більш опуклою та округлою. Безпосередньо під епідермою формується кільцеподібний шар кутової коленхіми, товщина якого варіює залежно від ділянки: з адаксіального боку вона представлена 2–5 шарами клітин, з абаксіального – кількома шарами, а з бічних сторін – одним клітинним шаром (рис. 3.8, 1, а).

Основна тканина черешка утворена паренхімою, клітини якої округлої форми, тонкостінні, різного розміру; у них часто трапляються друзи кальцію оксалату (рис. 3.8, 1, б), тоді як міжклітинні порожнини зустрічаються поодинокі. Провідна система представлена одним округлим пучком, зміщеним у бік адаксіальної поверхні (рис. 3.8, 1, в). Флоема і ксилема добре диференційовані та оточені шаром нездерв'янілих товстостінних клітин.

Листкова пластинка характеризується дорзивентральним типом анатомічної будови (рис. 3.8, 2). Палісадна хлоренхіма складається з одного-двох рядів дрібних тонкостінних клітин, тоді як губчаста хлоренхіма сформована трьома-чотирма рядами округлих клітин із незначними міжклітинниками (рис. 3.8, 3). Головна жилка має однопучкову будову та не виступає з абаксіального боку листкової пластинки. Центральний провідний пучок за формою та анатомічною організацією подібний до пучка черешка. З боку ксилеми добре розвинена дрібноклітинна товстостінна склеренхіма. Навколо бічних жилок формується характерна кристалоносна обкладинка, що складається з поодиноких кристалів і чітко виявляється при дослідженні з поверхні (рис. 3.8, 5, а). Нижня епідерма є

морфологічно неоднорідною та представлена двома типами клітин: у зоні жилок переважають прозенхімні клітини з прямими стінками, слабо потовщеними оболонками та прямими порами, тоді як між жилками розміщені паренхімні клітини з оболонками від майже прямих до слабо звивистих і незначно потовщених (рис. 3.8, 4).

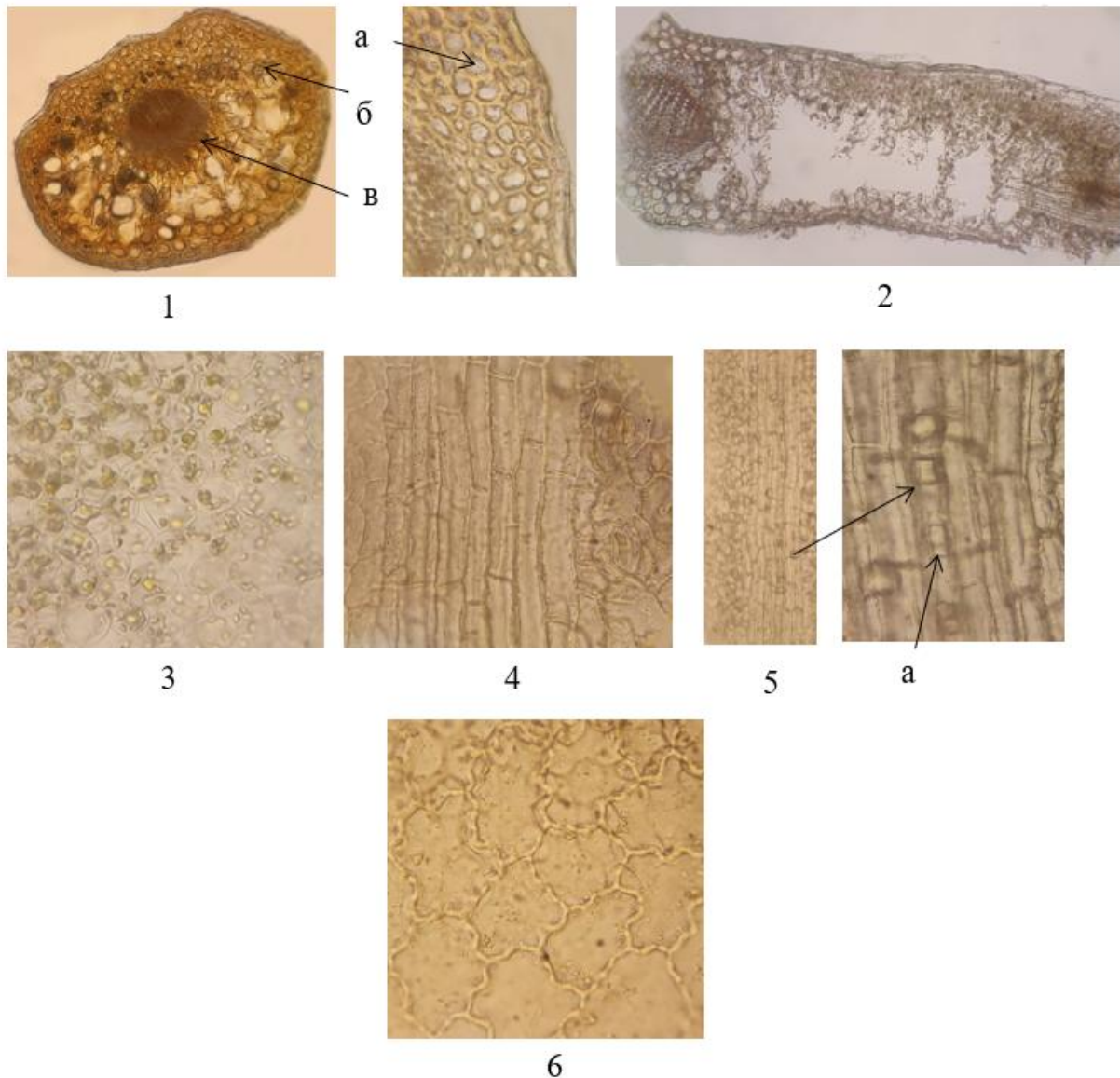


Рис. 3.8 Мікроскопічні ознаки листка журавлини великоплодої. 1 – черешок: а – коленхіма; б – друзи; в – провідний пучок; 2 – поперечний зріз пластинки; 3 – губчаста хлоренхіма (вид зверху); 4 – нижня епідерма; 5 – кристалічна обкладинка з поодинокими кристалами; а – на в/з; 6 – верхня епідерма. Мікрофото: Власова І. К. та проф. Гонтова Т. М. [131]

Продихи на нижній епідермі численні, переважно овальної форми; продиховий апарат належить до паразитного та аномоцитного типів. У клітинах, прилеглих до жилок, накопичуються прості призматичні та кубічні кристали кальцію оксалату, які разом формують кристалічну обкладинку. Верхня епідерма складається з паренхімних клітин однакової форми та розмірів із характерно звивистими оболонками (рис. 3.8, б); продихи на цій поверхні відсутні. Кутикула виражена слабо й має переривчасто-складчастий характер [130]. Клітини вздовж краю листкової пластинки дрібніші, видовжені, чотирикутної форми, з помірно потовщеними прямими оболонками.

За загальною анатомічною організацією черешок листка журавлини болотяної має подібність до черешка журавлини великоплодої, однак характеризується низкою чітких морфо-анатомічних відмінностей. Так, у поперечному перерізі форма черешка наближається до трикутної (рис. 3.9, 1). Адаксіальна поверхня при цьому є слабо виїмчастою, тоді як абаксіальна сторона зберігає округлі обриси.

Покривна тканина черешка підстеляється одним-двома шарами коленхіми. Основна тканина представлена дрібноклітинною паренхімою, клітини якої містять численні великі друзи кальцію оксалату (рис. 3.9, 1, а); між паренхімними елементами трапляються значні за розмірами міжклітинні порожнини (рис. 3.9, 1, в). Провідна система черешка сформована одним округлим пучком, що займає радіальне положення; елементи ксилеми та флоєми дрібноклітинні й чітко диференційовані (рис. 3.9, 1, б).

Анатомічна будова листкової пластинки журавлини болотяної в цілому відповідає дорзивентральному типу та є близькою до будови листка журавлини великоплодої (рис. 3.9, 2, а–ж). Клітини нижньої епідерми у зоні жилки переважно прямокутні, представлені прозенхімними та паренхімними елементами, у яких накопичуються призматичні кристали кальцію оксалату, що формують характерну кристалоносну обкладинку (рис. 3.9, 3, а). Між жилками нижня епідерма складається з лопатевих паренхімних клітин зі слабо потовщеними

оболонками (рис. 3.9, 3). Продихи численні, великі, овальної форми; продиховий апарат представлений аномоцитним і парацитним типами [2].

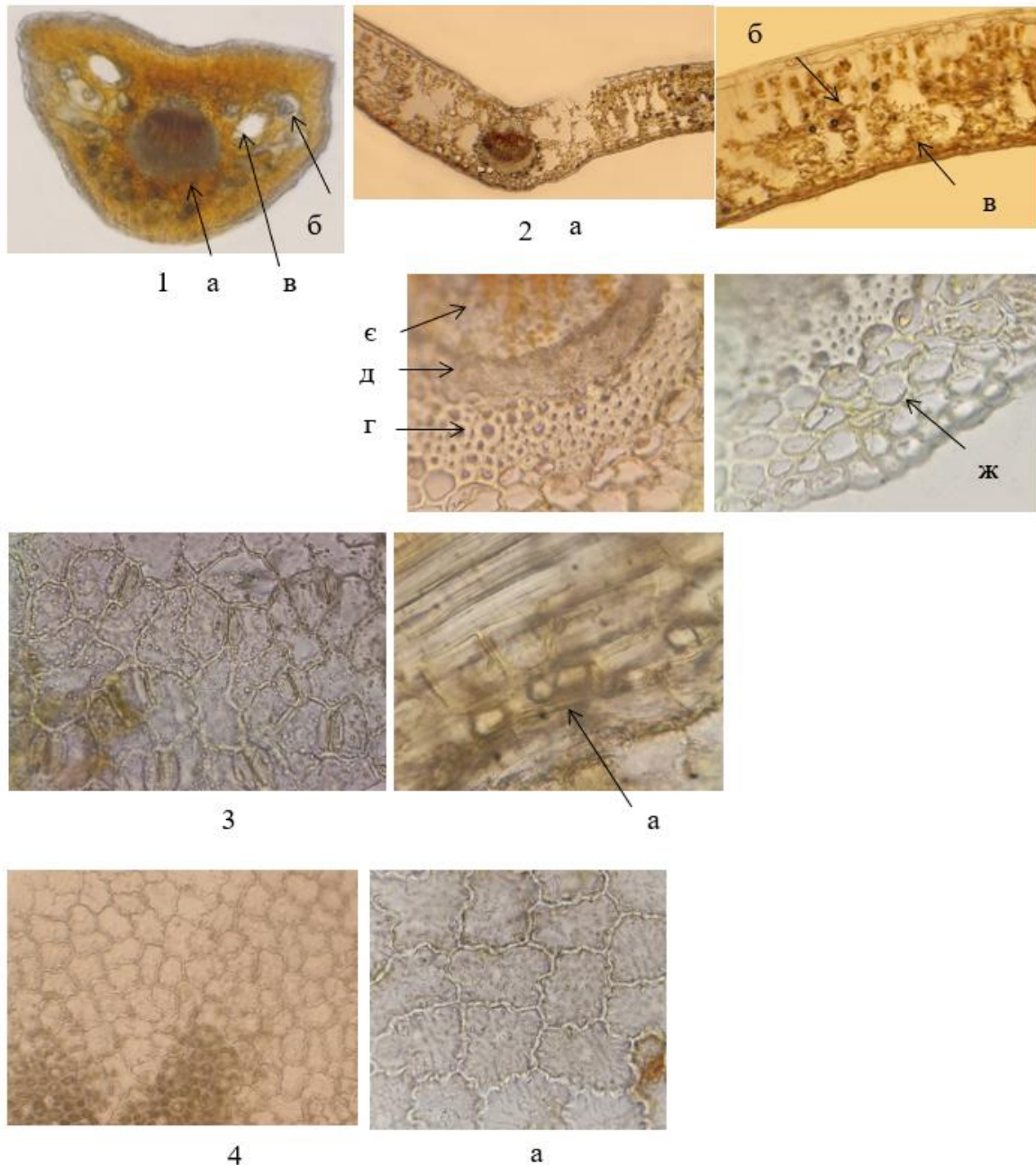


Рис. 3.9 Мікроскопічні ознаки листка журавлини болотної. 1 – черешок: а – друзи; б – провідний пучок; в – порожнини; 2 – поперечний зріз пластинки: а – головна жилка; б – стовпчаста хлоренхіма; в – губчаста хлоренхіма; г – склеренхімна обкладинка; д – флоєма; е – ксилема; ж – колєнхіма; 3 – нижня епідерма: а – кристалічна обкладинка жилки з поодиноких кристалів; 4 – верхня епідерма зі складчастою кутикулою: а – на в/з. Мікрофото: Власова І. К. та проф. Гонтова Т. М. [131]

Клітини верхньої епідерми паренхімні, з чітко вираженими звивистими оболонками; поверхня вкрита характерною штрихувато-складчастою кутикулою (рис. 3.9, 4, а).

На підставі мікроскопічного аналізу встановлено комплекс діагностично значущих анатомічних ознак стебел і листків журавлини великоплодої та журавлини болотної, зокрема особливості будови покривних тканин, механічних елементів, провідних пучків, характер включень (друзи, крохмальні зерна, кристали кальцію оксалату), а також морфологічні характеристики епідермісу й продихового апарату. Отримані мікродіагностичні критерії доповнюють результати макроскопічного аналізу та можуть бути використані для ідентифікації сировини й обґрунтування показників її якості [131].

### 3.3 Хімічний аналіз листя журавлини великоплодої та болотної

#### 3.3.1 Визначення елементного складу надземних органів журавлини великоплодої

За результатами атомно-емісійного спектрального аналізу (методика – розд. 2, п. 2.3) в листі, плодах і стеблах журавлини великоплодої було ідентифіковано 6 макроелементів (К, Са, Mg, Si, Р, Na) та 9 мікроелементів (Fe, Mn, Al, Zn, Cu, Mo, Sr, Ni, Co). Кількісні показники вмісту елементів наведено у таблиці 3.1.

*Таблиця 3.1*

#### **Кількісний вміст макро- та мікроелементів у різних органах журавлини великоплодої**

Елемент	Вміст елемента, мг/100 г сировини		
	листя	плоди <sup>#</sup>	стебла
1	2	3	4
Fe	15,7	10,4	5,4

Продовж. табл. 3.1

1	2	3	4
Si	155	125	80
P	80	93,8	54
Al	13,5	10,6	10,8
Mn	9,0	2,6	5,1
Mg	180	187,8	95
Pb	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Ni	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Mo	0,04	< 0,03	< 0,03
Ca	360	417	190
Cu	0,18	0,4	0,24
Zn	5,8	3,7	2,7
Na	70	81,3	60
K	1170	1666	730
Sr	0,67	0,6	0,67
Co	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cd	< 0,01	< 0,01	< 0,01
As	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Hg	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Примітка. # – у перерахунку на суху сировину.

Отримані результати свідчать про виражені відмінності в елементному складі між різними надземними органами журавлини великоплодої. За даними кількісного аналізу, в усіх досліджених органах домінуючим елементом є калій, максимальний вміст якого зафіксовано у плодах (1666 мг/100 г сировини), дещо нижчі значення характерні для листя (1170 мг/100 г сировини) та стебел (730 мг/100 г сировини). Подібна закономірність розподілу калію описана також для представників роду *Vaccinium*, зокрема *V. oxycoccos*, *V. macrocarpon*, *V.*

*myrtillus* та *V. corymbosum*, у яких калій є провідним макроелементом у листі та плодах, незалежно від виду [24, 132].

Другу позицію за вмістом займає кальцій, концентрація якого коливалася від 190 мг/100 г сировини у стеблах до 417 мг/100 г сировини у плодах. Магній і фосфор характеризувалися середніми рівнями накопичення, причому магній у листі (180 мг/100 г сировини) і плодах (187,8 мг/100 г сировини) перевищував його вміст у стеблах. Наведені результати відповідають тенденціям, описаним для листкової сировини *Vaccinium* spp. у перерахунку на суху масу [24, 132]. Слід зазначити, що всі кількісні показники наведено у перерахунку на золу, що зумовлює підвищені абсолютні значення концентрацій елементів.

Серед мікроелементів у всіх органах відносно високими були концентрації заліза та мангану. Вміст заліза у листі журавлини (15,7 мг/100 г сировини) перевищував його концентрацію у плодах і стеблах, що співвідноситься з даними для листя родини Ericaceae, де залізо також є одним із провідних мікроелементів. Манган характеризувався вираженою органоспецифічністю: його максимальний вміст зафіксовано у листі (9,0 мг/100 г сировини), тоді як у плодах цей показник був майже в чотири рази нижчим, що узгоджується з опублікованими результатами для журавлини та чорниці [24].

Цинк, мідь та стронцій були присутні у помірних кількостях, причому для цинку характерне поступове зниження вмісту від листя до стебел. Важливо, що у досліджених зразках вміст потенційно токсичних елементів (Pb, Cd, As, Hg, Co) перебував нижче межі визначення або на рівні слідів, що відповідає даним літератури для екологічно чистої рослинної сировини журавлини та підтверджує відсутність антропогенного забруднення.

Аналіз кількісних даних дозволив встановити закономірності накопичення мінеральних елементів у різних надземних органах журавлини великоплодої. Для *листя* характерна така послідовність макро- та мікроелементів:  $K > Ca > Mg > Si > P > Na > Fe > Al > Mn > Zn > Cu > Sr > Mo$  при відсутності кількісно значущих концентрацій Ni, Pb, Cd, Co, As і Hg. Для *плодів* спостерігається інший порядок накопичення елементів:  $K > Ca > Mg > Si > P > Na > Fe > Al > Zn > Mn > Cu > Sr$ ,

тоді як токсичні елементи не визначалися кількісно. У стеблах послідовність накопичення має вигляд:  $K > Ca > Mg > Si > P > Na > Fe > Al > Mn > Zn > Cu > Sr$ , що свідчить про загальну подібність мінерального профілю, але з меншою акумуляцією більшості елементів порівняно з листям і плодами.

Отримані результати демонструють виражену органоспецифічність накопичення мінеральних елементів у журавлині великоплодій, при цьому листя характеризується найвищим рівнем концентрації більшості мікроелементів, тоді як плоди – підвищеним вмістом калію, кальцію та магнію [133, 134]. Такий розподіл свідчить про відмінності між вегетативними й генеративними органами та є важливим для подальшої фармакогностичної оцінки рослинної сировини.

### 3.3.2 Визначення фенольних сполук методом високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням

За результатами ВЕРХ-ДАД-МС-аналізу (методика – розд. 2, п. 2.4) у листі журавлини великоплодої було ідентифіковано низку фенольних сполук, що належать до різних структурних груп, зокрема гідроксикарбонова та гідроксикорична кислоти, флавоноїди (флавоноли та флаван-3-оли), а також конденсовані таніни. Ідентифікацію сполук здійснювали на підставі часу утримування, УФ-спектральних характеристик, мас-спектрометричних даних у негативному іонному режимі ( $[M-H]^-$ ,  $MS^n$ ,  $MS^3$ ), а також шляхом порівняння з літературними даними та доступними стандартними зразками (табл. 3.2).

На рисунку 3.10 наведено ВЕРХ-хроматограму листя журавлини великоплодої: у верхній частині представлено хроматограму, отриману в режимі мас-спектрометричного детектування ( $MS^-$ ), у нижній – хроматограму, зареєстровану при довжині хвилі 254 нм.

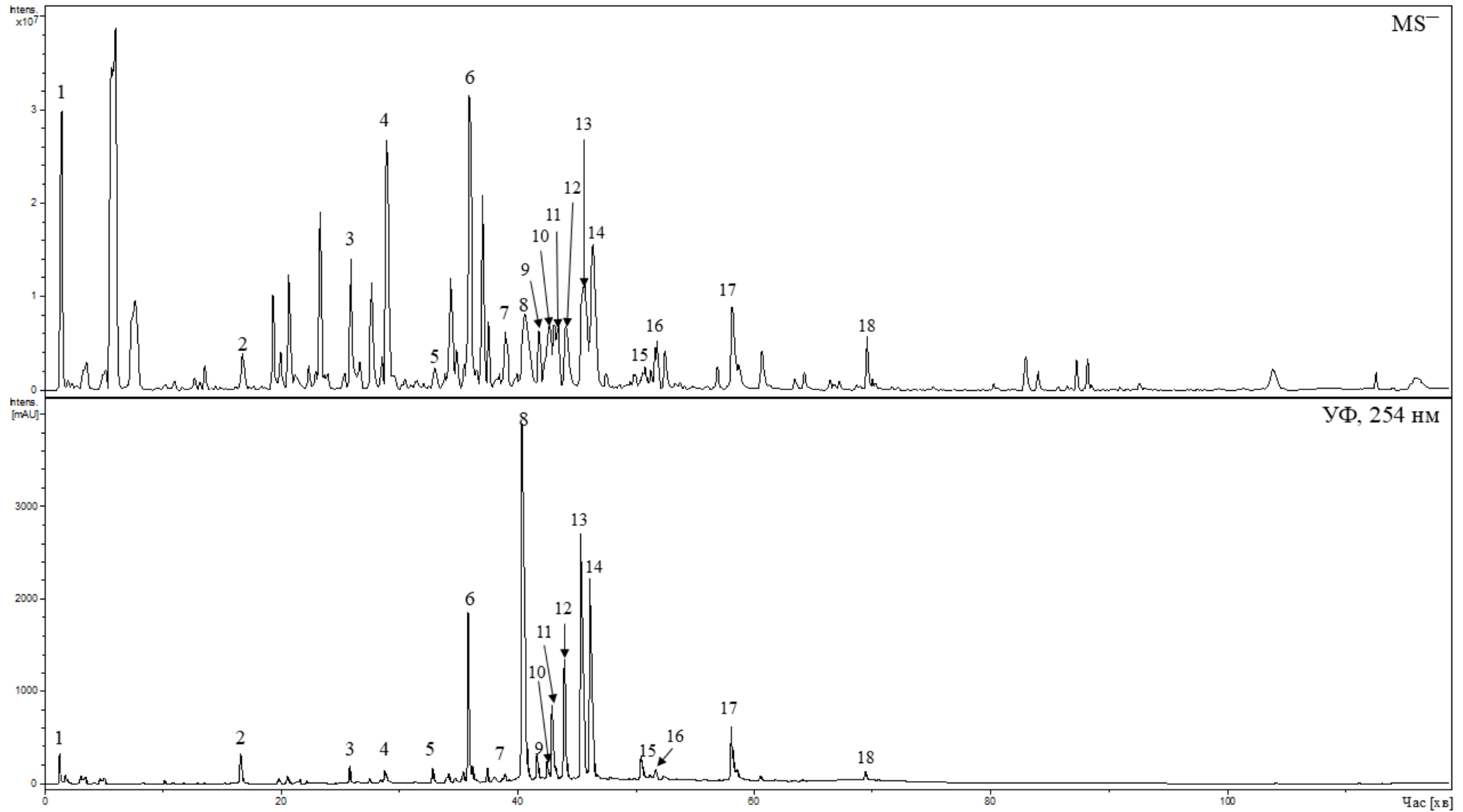


Рис. 3.10 Типова ВЕРХ-хроматограма листа журавлини великоплодої. Позначення піків відповідають номерам у таблиці 3.2

Таблиця 3.2

## Фенольні сполуки в листі журавлини, ідентифіковані методом ВЕРХ-ДАД-аналізу

№	Час аналізу, хв	УФ, нм	[М-Н] (-), <i>m/z</i>	Іони MS <sup>n</sup> (-)	Іони MS <sup>3</sup>	Сполуки	Літ. джерело
1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,5	212, 352	191	191	-	Хінна кислота	[25]
2	16,8	244, 324	353	290, 191, 179, 177, 135	-	4- <i>O</i> -кофеїлхінна кислота	ст
3	26,0	196, 234	385	-	-	Невідома сполука	-
4	29,0	225, 278	289	271	-	(+)-катехін	ст
5	32,9	220, 279	863	711, 693, 573, 559, 542, 531, 451, 411, 289	693, 559, 543, 525, 463, 425, 407, 285	Проантоціанідин типу А	[135, 136]
6	36,0	213, 250	473	427, 293, 233	-	Невідома сполука	-
7	37,6	210, 278	463	427, 317, 314, 301, 300, 293	-	Невідома сполука	-
8	40,7	220, 255, 354	463	445, 433, 311, 301, 300, 299, 273, 271	271	Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид	ст
9	41,8	255, 354	463	373, 301, 300, 271	271	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид	[137]
10	42,7	225, 280, 311	575	539, 513, 449, 423, 407, 327, 285	405, 361, 297, 285	Димер проціанідину А2	[135, 137]

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8
11	43,1	212, 254, 354	433	301, 300, 299, 283, 273, 255	271, 255	Кверцетин-3- <i>O</i> -ксилозид	ст
12	44,2	212, 255, 354	433	415, 343, 325, 302, 301, 271	-	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабінопіранозид	ст
13	45,7	219, 255, 352	433	343, 325, 301, 300, 299, 279	283, 271	Кверцетин-3- <i>O</i> -арабінофуранозид	ст
14	46,4	214, 255, 350	447	325, 301, 300, 297, 271	271, 255	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид	ст
15	50,6	225, 260, 357	609	535, 489, 464, 463, 382, 302, 301, 271	301, 179	Кверцетин- <i>O</i> - <i>p</i> -кумароїл-гексозид-1	[137]
16	51,9	199, 264, 342	431	327, 285, 284, 271, 269, 255	-	Кемпферол-3- <i>O</i> -рамнозид	[6]
17	58,2	207, 266, 313	609	594, 464, 463, 301, 271	301	Кверцетин- <i>O</i> - <i>p</i> -кумароїл-гексозид-2	[137]
18	69,6	202, 270, 356	593	463, 445, 325, 301, 271	-	Похідне кверцетину	[137]

Примітки:

1. - – відсутні данні;
2. ст – ідентифікація підтверджена стандартним зразком.

Отримані дані свідчать про складний і багатокомпонентний фенольний профіль листя журавлини великоплодої. У ранній частині хроматограми ідентифіковано гідроксикарбонові та гідроксикоричні кислоти, зокрема хінну та 4-*O*-кофеїлхінну (хлорогенову) кислоти, що характеризувалися коротким часом утримування та типовими спектральними ознаками. Наявність цих сполук є характерною для представників роду *Vaccinium* і узгоджується з літературними даними щодо фенольного складу журавлини [25].

Флаван-3-оли та конденсовані таніни у листі журавлини представлені (+)-катехіном, проантоціанідинам типу А та димером проціанідину А<sub>2</sub>. Виявлені мас-спектрометричні патерни фрагментації відповідають характерним ознакам А-типу проантоціанідинів, описаних для журавлини [135, 136].

Найбільш чисельно представленою групою фенольних сполук у досліджуваному зразку є флавонолглікозиди, переважно похідні кверцетину. Ідентифікація різних глікозидних та ацильованих форм кверцетину свідчить про значну структурну різноманітність флавоноїдів у листі журавлини великоплодої, що узгоджується з результатами метаболомних досліджень фенольного складу журавлини [137]. Виявлення кемпферол-3-*O*-рамнозиду додатково підтверджує наявність у досліджуваній сировині флавонолів, характерних для рослин родини Ericaceae [6].

Отримані результати підтверджують типову для журавлини фенольну композицію та розширюють дані щодо фенольного складу листя *O. macrocarpus*.

### 3.3.3 Якісний тонкошаровий хроматографічний аналіз фенольних сполук листя журавлини великоплодої та журавлини болотної

Якісну ідентифікацію фенольних сполук у листі журавлини великоплодої та журавлини болотної проводили методом тонкошарової хроматографії згідно з наведеною методикою (розд. 2, п. 2.5).

За результатами ТШХ-аналізу у випробовуваних витягах з листя журавлини великоплодої виявлено зони флуоресценції, положення та характер забарвлення

яких відповідали зонам стандартних зразків хлорогенової кислоти, гіперозиду, рутину та кверцетину (рис. 3.11). Найбільш чітке та відтворюване розділення зон спостерігалось при нанесенні 15 мкл випробовуваного розчину, що дозволило визначити даний об'єм як оптимальний.

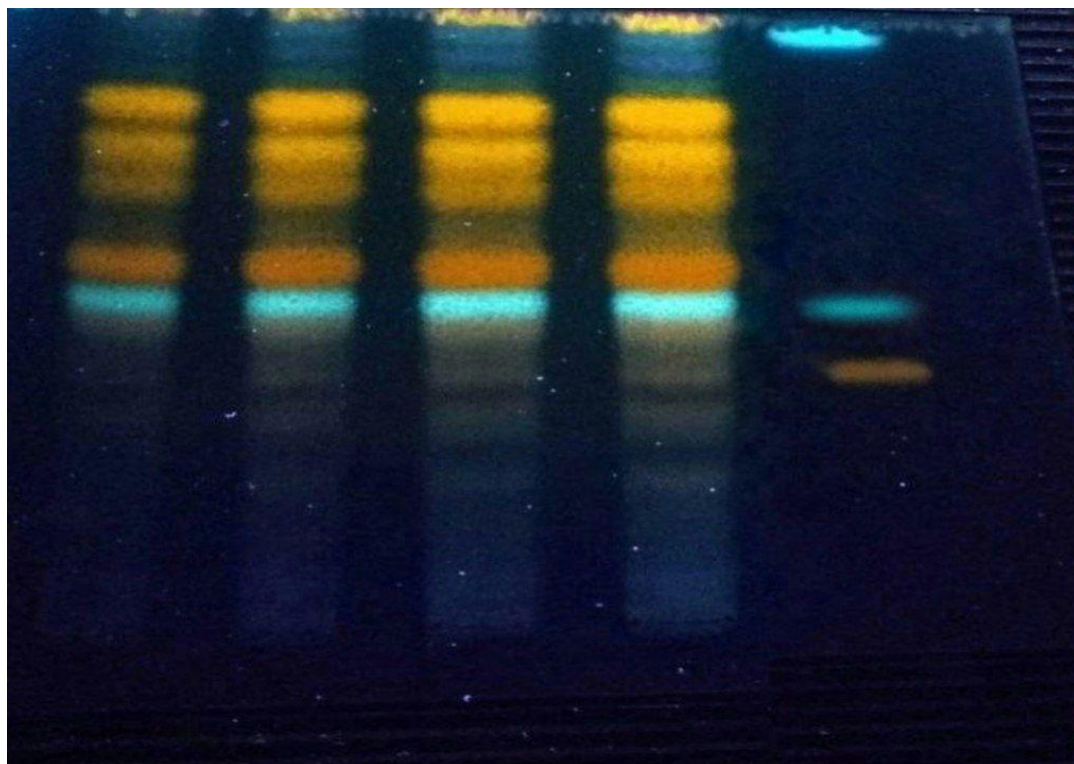


Рис. 3.11 ТШХ-хроматограма листя журавлини великоплодої при різних об'ємах нанесення випробовуваного розчину (5–20 мкл); стандартні зразки – гіперозид, хлорогенова кислота, кофейна кислота

За наведеною методикою також проведено ТШХ-аналіз листя журавлини болотної з використанням інших об'ємів проб. Результати аналізу наведено на рис. 3.12.

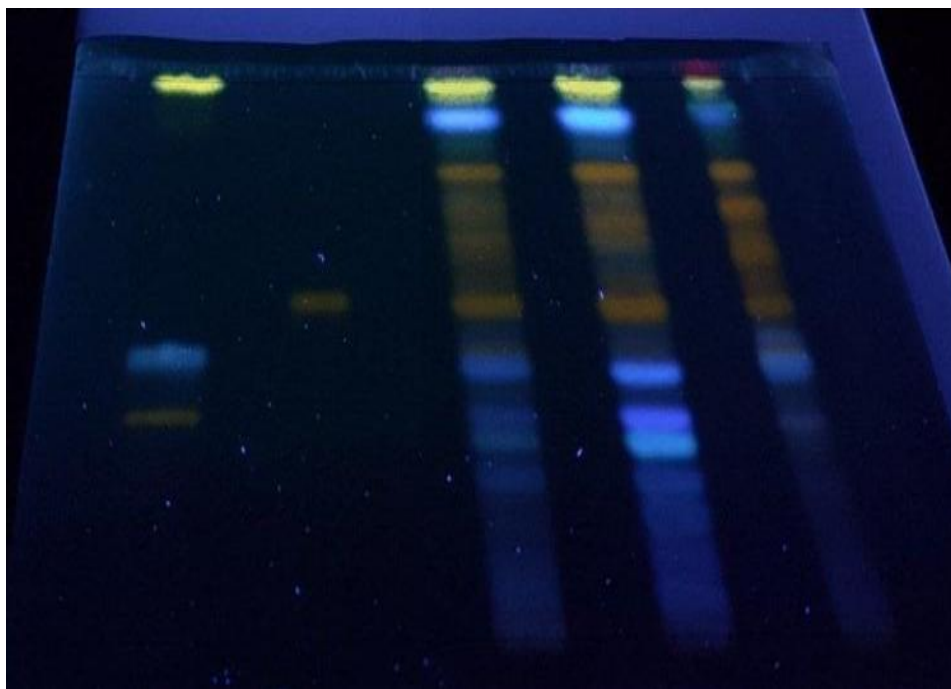


Рис. 3.12 ТШХ листя журавлини болотної. Смуги зліва направо: розчин стандартів (рутин, хлорогенова кислота, кверцетин); стандартний зразок гіперозиду; випробовувані розчини з об'ємом нанесення 10, 15 та 5 мкл

Дані щодо ТШХ-ідентифікації фенольних сполук у листі журавлини в літературі відсутні, однак описана для плодів журавлини та інших видів *Vaccinium* ідентифікація хлорогенової кислоти, гіперозиду й кверцетину підтверджує типовість виявленого фенольного профілю для родини Ericaceae [132].

Отримані результати підтверджують доцільність використання обраної ТШХ-методики для якісної ідентифікації основних груп фенольних сполук у листі журавлини та дозволяють розглядати її як придатну для цілей стандартизації даного виду рослинної сировини.

### 3.3.4 Визначення кількісного вмісту груп біологічно активних речовин спектрофотометричним методом

Результати спектрофотометричного аналізу засвідчили наявність кількісних відмінностей у вмісті фенольних сполук (методика – розд. 2, п. 2.7) у листі

журавлини великоплодої та журавлини болотної, що відображає видові особливості хімічного складу досліджуваної сировини.

Сумарний вміст фенольних сполук у листі журавлини великоплодої був вищим порівняно з журавлиною болотною і становив  $4,22 \pm 0,07$  % проти  $3,75 \pm 0,05$  % відповідно. Таким чином, листя журавлини великоплодої характеризується більш високим рівнем накопичення фенольних компонентів.

Аналогічну тенденцію встановлено і для флавоноїдів (методика – розд. 2, п. 2.9). Їхній вміст у листі журавлини великоплодої становив  $1,28 \pm 0,04$  %, тоді як у листі журавлини болотної –  $1,11 \pm 0,09$  %.

Найбільш виражені міжвидові відмінності спостерігалися для гідроксикоричних кислот (методика – розд. 2, п. 2.11). У листі журавлини великоплодої їхній вміст у перерахунку на хлорогенову кислоту становив  $3,85 \pm 0,06$  %, що перевищувало відповідний показник для журавлини болотної ( $3,04 \pm 0,03$  %). Це вказує на більш вагомий внесок гідроксикоричних кислот у фенольний комплекс листя журавлини великоплодої.

*Таблиця 3.3*

**Кількісний вміст основних груп фенольних сполук у листі журавлини великоплодої та журавлини болотної**

Група	Вміст у сировині (% , n = 5)	
	Журавлина великоплода	Журавлина болотна
Сума фенольних сполук	$4,22 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,05$
Сума флавоноїдів	$1,28 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,09$
Сума гідроксикоричних кислот	$3,85 \pm 0,06$	$3,04 \pm 0,03$

Узагальнюючи отримані результати, можна зазначити, що листя журавлини великоплодої характеризується вищим вмістом усіх досліджуваних груп фенольних сполук порівняно з листям журавлини болотної [131]. Виявлені

відмінності, імовірно, зумовлені видовими особливостями рослин, а також відмінностями екологічних умов їх зростання.

### Висновки до розділу 3

1. Проведено комплексне фармакогностичне дослідження надземних органів журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh) та журавлини болотної (*Oxycoccus palustris* Pers.), яке включало макро- і мікроскопічний аналіз, а також вивчення хімічного складу листя і пагонів.

2. Встановлено характерні макроскопічні ознаки листя та пагонів журавлини великоплодої і журавлини болотної, що забезпечують їх чітку морфологічну диференціацію та можуть бути використані для первинної ідентифікації рослинної сировини.

3. За результатами мікроскопічного аналізу визначено комплекс діагностично значущих анатомічних ознак листя і стебел досліджуваних видів, зокрема особливості будови епідерми, механічних і провідних тканин, характер кристалічних включень (друзи та призматичні кристали кальцію оксалату), а також типи продихового апарату, що використано для формування діагностичних критеріїв сировини.

4. Методом атомно-емісійного спектрального аналізу встановлено елементний склад надземних органів журавлини великоплодої та виявлено органоспецифічні особливості накопичення макро- і мікроелементів. Найвищі концентрації макроелементів відмічено для калію, кальцію та магнію, тоді як серед мікроелементів у листі переважали залізо, манган, цинк і мідь. Листя характеризувалося вищим рівнем накопичення більшості мікроелементів порівняно зі стеблами та плодами, а вміст потенційно токсичних елементів перебував на рівні слідів або нижче межі визначення.

5. За допомогою ВЕРХ-ДАД-МС у листі журавлини великоплодої ідентифіковано широкий спектр фенольних сполук, зокрема хінна та хлорогенова

кислоти, флавоноли (похідні кверцетину та кемпферолу), флаван-3-оли та конденсовані таніни, з домінуванням проантоціанідинів А-типу.

6. Вперше якісним ТШХ-аналізом підтверджено наявність у листі журавлини великоплодої та журавлини болотної основних фенольних маркерів – хлорогенової кислоти, гіперозиду, рутину та кверцетину, що свідчить про типовість фенольного профілю для видів роду *Vaccinium* та придатність методу для ідентифікаційних цілей.

7. Спектрофотометричним методом встановлено, що листя журавлини великоплодої характеризується вищим вмістом суми фенольних сполук, флавоноїдів і похідних гідроксикоричних кислот порівняно з листям журавлини болотної, що обґрунтовує доцільність його використання як перспективного джерела біологічно активних речовин.

*Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:*

1. Мінеральний склад надземних органів журавлини великоплодої / І. К. Власова, О. М. Кошовий, М. А. Комісаренко, А. М. Ковальова, Т. В. Ільїна. *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 1. С. 46–49. DOI: 10.33617/2522-9680-2020-1-46

2. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. leaves / I. Vlasova, T. Gontova, L. Grytsyk, G. Zhumashova, G. Sayakova, A. Boshkayeva, M. Shanaida, O. Koshovyi. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352

3. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results / A. Raal, M. Kõiva, A. Kuperjanov, K. Vilbaste, I. Vlasova, O. Koshovyi. *Folklore*. 2023. Vol. 89, P. 107–142. DOI:10.7592/FEJF2023.89.cranberries

4. Власова І. К., Кошовий О. М. Дослідження елементного складу журавлини великоплодої. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVII Міжнародної наук.–практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 8–10 квіт. 2020 р. Харків: НФаУ, 2020, С. 30–31.

## РОЗДІЛ 4

### ФІТОХІМІЧНЕ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЕКСТРАКТІВ З ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ

Фенольні сполуки є однією з ключових груп БАР листя журавлини великоплодої, а їх кількісний вміст і якісний склад суттєво залежать від способу екстракції. Вибір екстрагенту, методу та технологічних параметрів екстракції визначає ефективність вилучення цільових компонентів, відтворюваність складу екстрактів і можливість подальшої стандартизації отриманих субстанцій. У зв'язку з цим розробка науково обґрунтованих підходів до отримання екстрактів листя журавлини є необхідним етапом їх подальшого хімічного та фармакологічного вивчення [138–141].

У цьому розділі представлено результати досліджень, спрямованих на оптимізацію процесу екстракції фенольних сполук з листя журавлини великоплодої, включно з вибором екстрагенту та методу екстракції, визначенням оптимальної кратності процесу, отриманням сухого екстракту та екстрактів з додаванням амінокислот. Для характеристики отриманих екстрактів проведено попередній хімічний аналіз, елементний аналіз, а також якісну й кількісну оцінку фенольних сполук із застосуванням методів ТШХ, ВЕРХ-ФДМ та спектрофотометрії. Отримані фітохімічні характеристики слугували підґрунтям для подальшої оцінки фармакологічних властивостей екстрактів, зокрема їх протизапальної, антиоксидантної та інших видів біологічної активності, представлених у відповідних підрозділах.

#### 4.1 Розробка способів одержання екстрактів

##### 4.1.1 Вибір екстрагенту та параметрів екстракції фенольних сполук

Вибір екстрагенту та способу екстракції є визначальним етапом розробки технології отримання рослинних екстрактів, оскільки саме ці параметри впливають

на повноту вилучення фенольних сполук і відтворюваність результатів. З огляду на це, для екстракції фенольних сполук із листя журавлини великоплодої було обрано метод мацерації, який, згідно з узагальненими літературними даними, є одним із найбільш поширених і технологічно доступних способів вилучення поліфенолів із рослинної сировини [100, 142].

Як екстрагент використовували 50 % розчин етанолу. Вибір етанолу зумовлений його меншою токсичністю порівняно з метанолом і можливістю застосування отриманих екстрактів у подальших фітохімічних та фармакологічних дослідженнях. Етанол-водні розчини широко використовуються для екстракції поліфенолів різної полярності та розглядаються як методично доцільні розчинники для досліджень БАР [25, 100, 143].

Екстракція фенольних сполук із рослинної сировини є багатостадійним масообмінним процесом, ефективність якого залежить як від співвідношення сировина : екстрагент, так і від кількості послідовних екстракцій. Для листя журавлини великоплодої ці параметри мають принципове значення, оскільки фенольні сполуки характеризуються різною полярністю та різною доступністю в межах клітинного матриксу, що впливає на швидкість і повноту їх переходу в розчин [139].

У межах експериментальних досліджень було проаналізовано вплив співвідношення сировина : екстрагент у діапазоні 1:10–1:35 та кратності екстракції (від одного до чотирьох послідовних витягів) на вміст сумарних фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту (методика – розд. 2, п. 2.8). Отримані дані узагальнені в табл. 4.1 [144].

Таблиця 4.1

**Вміст сумарних фенольних сполук у витягах з листя журавлини  
великоплодої за різної кратності екстракції**

Співвідношення сировина : екстрагент	Вміст фенольних сполук у перерахунку на галову кислоту (% , n = 5)			
	Екстракція 1	Екстракція 2	Екстракція 3	Екстракція 4
1:10	3,28 ± 0,08	1,26 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,21 ± 0,01
1:15	3,39 ± 0,07	1,12 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,19 ± 0,02
1:20	3,47 ± 0,07	0,88 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,04 <sup>e</sup>
1:25	4,00 ± 0,11	0,87 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,05 <sup>e</sup>
1:30	4,73 ± 0,07	0,65 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,03 <sup>e</sup>
1:35	4,69 ± 0,07	0,62 ± 0,03	0,01 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>

Примітка. <sup>e</sup> – стандартне відхилення не наведене через низький рівень аналітичного сигналу.

Показано, що незалежно від обраного співвідношення сировина : екстрагент основна кількість фенольних сполук вилучається під час першої екстракції. Так, при співвідношенні 1:10 сумарний вміст фенольних сполук у першому витягу становив  $3,28 \pm 0,08$  %, тоді як друга екстракція забезпечувала лише  $1,26 \pm 0,04$  %, а третя –  $0,34 \pm 0,02$  %. Аналогічна тенденція зниження внеску другої та третьої екстракцій спостерігалася також для гідроксикоричних кислот і флавоноїдів (методики – розд. 2, п. 2.10, п. 2.11; табл. 4.2) [144–146].

Таблиця 4.2

**Вміст гідроксикоричних кислот і флавоноїдів у витягах з  
листя журавлини великоплодої за різної кратності екстракції (% , n = 5)**

Співвідношення	Екстракція	Гідроксикоричні кислоти (у перерахунку на хлорогенову кислоту)	Флавоноїди (у перерахунку на рутин)
1	2	3	4
1:10	1	$0,98 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,01$

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4
1:10	2	$0,38 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$
	3	$0,10 \pm 0,01$	$0,06^e$
	4	$0,03^e$	$0,02^e$
1:15	1	$1,25 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,03$
	2	$0,39 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$
	3	$0,12 \pm 0,01$	$0,05^e$
	4	$0,04^e$	$0,01^e$
1:20	1	$1,32 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,11$
	2	$0,24 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,07$
	3	$0,03^e$	$0,03^e$
	4	$0,00^e$	$0,00^e$
1:25	1	$1,55 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,04$
	2	$0,34 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$
	3	$0,05^e$	$0,03^e$
	4	$0,01^e$	$0,00^e$
1:30	1	$1,76 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,07$
	2	$0,25 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
	3	$0,05^e$	$0,03^e$
	4	$0,01^e$	$0,00^e$
1:35	1	$1,81 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,05$
	2	$0,24 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,02$
	3	$0,02^e$	$0,03^e$
	4	$0,00^e$	$0,00^e$

Примітка. <sup>e</sup> – стандартне відхилення не наведене через низький рівень аналітичного сигналу.

Збільшення кількості екстрагенту (1:15–1:35) призводило до деякого зростання виходу екстракту на першій стадії. Наприклад, при співвідношенні 1:30 сумарний вміст фенольних сполук у першому витягу становив  $4,73 \pm 0,07$  %, а при 1:35 –  $4,69 \pm 0,07$  %, що лише незначно перевищувало відповідний показник для співвідношення 1:10. Водночас подальші екстракції за цих умов характеризувалися різким зменшенням вмісту фенольних сполук, а четвертий витяг в більшості випадків містив лише слідові кількості біологічно активних речовин.

Виявлена закономірність узгоджується з описаним у літературі явищем зниження ефективності повторних екстракцій унаслідок досягнення рівноважного

стану між рослинною сировиною та екстрагентом, а також зменшення градієнта концентрацій, що обмежує подальшу дифузію сполук у розчин [139, 142].

Окремий аналіз кратності процесу показав, що проведення більше трьох послідовних екстракцій не є доцільним, оскільки четверта екстракція характеризується мінімальним вмістом фенольних сполук (0,01–0,05 %), що знаходиться на межі аналітичної значущості. Подібні закономірності описані й у роботах інших авторів, де показано, що збільшення кількості послідовних екстракцій супроводжується різким зниженням приросту цільових компонентів, унаслідок чого багаторазове повторення процесу після 2–3 циклів розглядається як технологічно та економічно недоцільне [138].

Таким чином, результати експериментальних досліджень дозволили обґрунтувати вибір співвідношення 1:10 та трикратної екстракції як оптимальних умов для подальших етапів розробки способів отримання рідких і сухих екстрактів з листя журавлини великоплодої та їх модифікації амінокислотами.

#### 4.1.2 Спосіб отримання сухого екстракту

Листя журавлини великоплодої (250 г), попередньо висушене та подрібнене до фракції 1–2 мм, екстрагували 50 % етанолом. Екстракцію проводили тричі методом мацерації, кожного разу з використанням 1,25 л свіжої порції екстрагенту та настоєм протягом 12 годин за кімнатної температури.

Після кожного циклу мацерації екстракти об'єднували, отримані витяги відстоювали протягом двох діб, після чого фільтрували через паперовий фільтр. Очищений екстракт концентрували шляхом вакуумного упарювання та доводили до сухого стану у сушильній шафі.

У результаті одержували сухий екстракт у вигляді пухкого порошку бурого кольору зі специфічним запахом, який використовували як вихідну субстанцію для подальших фітохімічних і фармакологічних досліджень. Вихід сухого екстракту становив 24,2 %.

Новизну та оригінальність запропонованого способу одержання екстракту з листя журавлини великоплодої підтверджено патентом України на винахід (№ 127117) та корисну модель (№ 147975) [147, 148].

#### 4.1.3 Розробка способу одержання екстрактів журавлини з додаванням амінокислот

Для одержання екстракту використовували 500 г висушеного, подрібненого листя журавлини великоплодої з розміром частинок 1–2 мм. Екстракцію проводили методом мацерації 50 % етанолом у трикратній екстракції (по 3 л на кожний цикл) за кімнатної температури протягом 12 год. Після завершення екстракції об'єднані витяги відстоювали протягом двох діб та фільтрували крізь паперовий фільтр.

Для отримання модифікованих екстрактів визначали вміст фенольних сполук у рідкому екстракті в перерахунку на галову кислоту, який становив 1,04 % (методика – розд. 2, п. 2.8). Отриманий екстракт розподіляли на вісім рівних частин. Першу частину екстракту згущували шляхом упарювання, після чого піддавали висушуванню до постійної маси з одержанням нативного сухого екстракту (Е).

До решти частин екстракту (по 500 мл кожна) поетапно додавали амінокислоти у трикратній кількості, еквімолярній кількості фенольних сполук, розрахованій за галовою кислотою. Для модифікації використовували амінокислоти з різними фізико-хімічними властивостями: валін (10,5 г; Е + В), аргінін (15,71 г; Е + Ар), аланін (8,03 г; Е + Ал), гліцин (6,77 г; Е + Гл), гістидин (14,00 г; Е + Г), аспарагінову кислоту (11,98 г; Е + Ас) та таурин (11,41 г; Е + Т) (рис. 4.1), які вводили у вигляді індивідуальних амінокислот аналітичної чистоти ( $\geq 98$  %; Sigma-Aldrich, США). Після модифікації екстракти згущували у вакуумі на ротаційному випарнику, після чого висушували у сушильній шафі при температурі 100–105 °С до постійної маси.

Застосування амінокислот як модифікувальних агентів рослинних екстрактів ґрунтується на їх здатності вступати в нековалентні взаємодії з фенольними сполуками, зокрема через водневі зв'язки, іонні пари та гідрофобні взаємодії, що

може впливати на фізико-хімічні характеристики поліфенольних комплексів. Молекулярні аспекти таких взаємодій детально описані для фенол–білкових систем та азотовмісних біомолекул, що містять амінокислотні фрагменти, де показано залежність поведінки поліфенолів від природи білкових і амінокислотних компонентів [149]. Поряд із цим, у літературі наведені дані про можливість впливу амінокислот на кількісний склад і співвідношення фенольних сполук у рослинній сировині та екстрактах [150]. З урахуванням наведеного, використання амінокислот різної хімічної природи для модифікації екстрактів листя журавлини великоплодої є методично обґрунтованим підходом для оцінки можливого впливу таких добавок на фенольний профіль екстрактів.

Нативний сухий екстракт листя журавлини являв собою пухкий порошок бурого кольору зі специфічним запахом. Після додавання амінокислот спостерігали зміну зовнішнього вигляду екстрактів, зокрема появу рожево-червоних відтінків, що може свідчити про наявність антоціанових сполук. Одержані екстракти зберігали у герметично закритих ємностях у темному місці при температурі +4 °С до подальшого фітохімічного та фармакологічного дослідження.

Запропонований спосіб одержання екстракту з листя журавлини великоплодої у поєднанні з аргініном (рис. 4.1) захищений патентом України на вихід (№ 127117) та корисну модель (№ 147975) [147, 148].

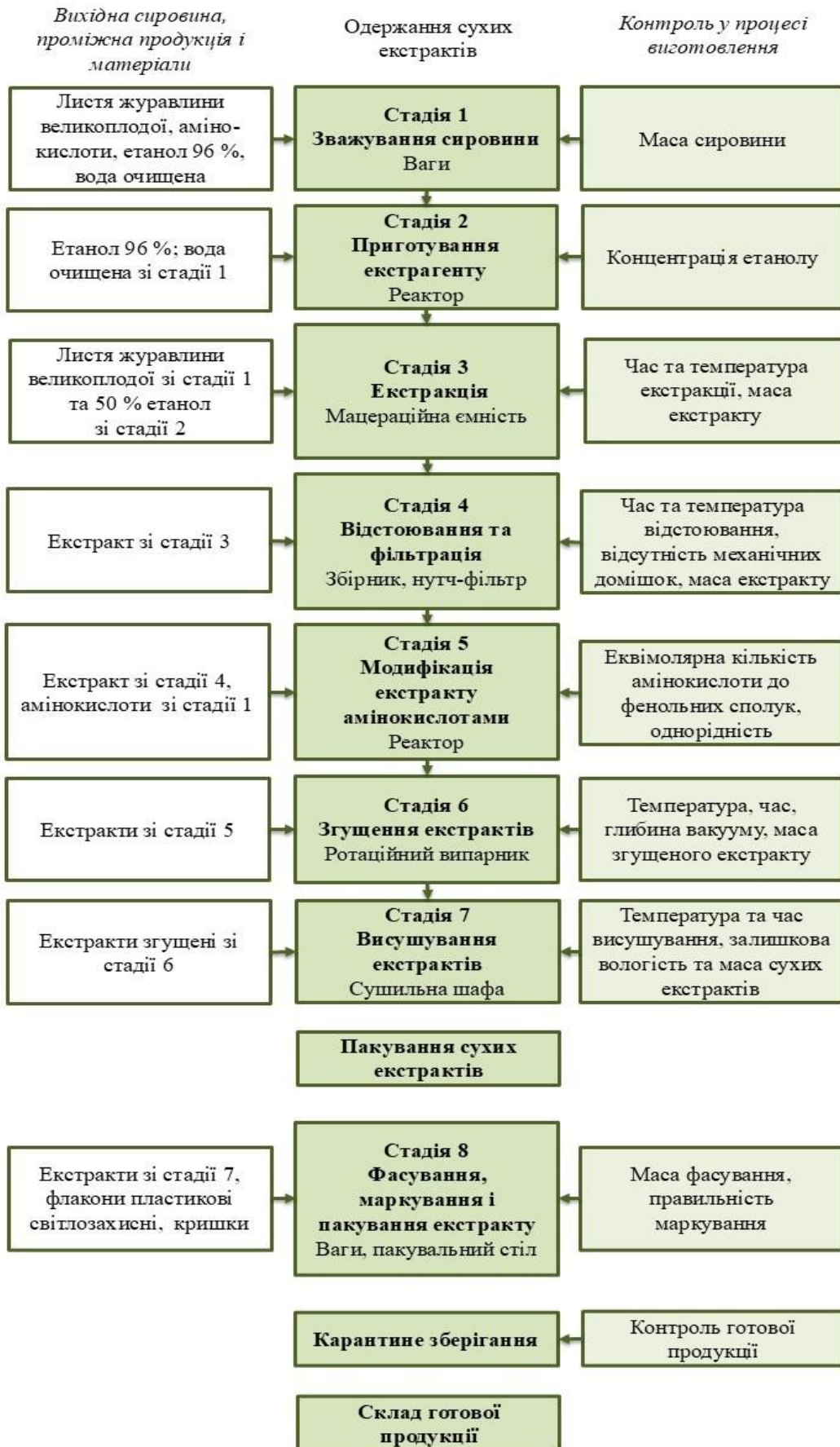


Рис. 4.1 Схема одержання модифікованих амінокислотами екстрактів з листя журавлини великоплодої



У розчині порівняння нанесено стандартні зразки хлорогенової кислоти, гіперозиду та кверцетину. У випробовуваному розчині виявлено зони флуоресценції, що відповідають стандартним сполукам за положенням і характером забарвлення в УФ-світлі (365 нм). За результатами аналізу доступних літературних джерел відсутні дані щодо ідентифікації фенольних сполук у листі журавлини великоплодої методом ТШХ. Водночас аналогічні фенольні компоненти – хлорогенова кислота, гіперозид, кверцетин та споріднені сполуки – були ідентифіковані методом ТШХ в екстрактах ягід журавлини та інших представників роду *Vaccinium*, що узгоджується з отриманими результатами [151, 152].

Отримані хроматограми свідчать про наявність у складі екстрактів гідроксикоричних кислот і флавоноїдів, що підтверджує фенольну природу БАР листя журавлини великоплодої.

#### 4.3 Елементний аналіз екстракту

Результати елементного аналізу (методика – розд. 2, п. 2.3) показали, що сухий екстракт з листя журавлини великоплодої характеризується високою концентрацією макроелементів, що відображає мінеральний потенціал вихідної сировини – листя, та особливості її екстракційної обробки (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

#### **Кількісний вміст макро- і мікроелементів у екстракті з листя журавлини великоплодої**

Елемент	Вміст елемента, мг/100г сировини
1	2
Fe	3,90
Si	50,00
P	110,00

Продовж. табл. 4.3

1	2
Al	7,30
Mn	9,30
Mg	195,00
Pb	< 0,03
Ni	< 0,03
Mo	0,03
Ca	345,00
Cu	0,20
Zn	2,90
Na	200
K	1300
Sr	0,34
Co	< 0,03
Cd	< 0,01
As	< 0,01
Hg	< 0,0

Провідним елементом у складі екстракту є калій, вміст якого становить 1300 мг/100 г сировини, що не лише підтверджує його ключову роль у мінеральному обміні рослини, а й свідчить про високу ефективність переходу цього елемента в екстракт порівняно з листям.

Значні кількості кальцію (345 мг/100 г сировини) та магнію (195 мг/100 г сировини) формують основу мінерального профілю екстракту. Такий розподіл макроелементів узгоджується з даними щодо переважного накопичення цих елементів у вегетативних органах журавлини великоплодої, однак їх співвідношення в екстракті свідчить про певну трансформацію елементного складу, обумовлену умовами мацерації. Підвищений

вміст натрію (200 мг/100 г сировини) та фосфору (110 мг/100 г сировини) порівняно з листковою сировиною може бути пов'язаний з більшою рухливістю цих елементів та їх кращою розчинністю у водно-етанольному середовищі.

Мікроелементний склад екстракту відзначається вибірковістю переходу окремих елементів із рослинної матриці. Так, манган зберігає високий рівень накопичення (9,3 мг/100 г сировини), що відповідає його органоспецифічному збагаченню у листі. Натомість концентрація заліза в екстракті (3,9 мг/100 г сировини) є нижчою порівняно з листками, що може свідчити про обмежену екстрагованість цього елемента або його часткову втрату під час технологічної обробки [133].

Потенційно токсичні елементи (Pb, Cd, As, Hg, Ni, Co) у складі екстракту не виявлялися у кількісно значущих концентраціях, що узгоджується з результатами аналізу надземних органів журавлини великоплодої та підтверджує екологічну безпечність як вихідної рослинної сировини, так і отриманого екстракту.

Отримані результати підтверджують, що екстракт з листя журавлини великоплодої відображає характерні для листкової сировини закономірності елементного складу. Це свідчить про доцільність використання екстракту для подальших фармакогностичних та біохімічних досліджень.

#### 4.4 Аналіз фенольних сполук методом високоефективної рідинної хроматографії з фотодіодним матричним детектором

Метод ВЕРХ-ФДМ застосовано для характеристики фенольного профілю екстрактів листя журавлини великоплодої (методика – розд. 2, п. 2.13). Реєстрацію хроматограм здійснювали за довжини хвилі 325 нм, що є інформативною для фенольних кислот, флавоноїдів та проантоціанідинів (рис. 4.3) [153].

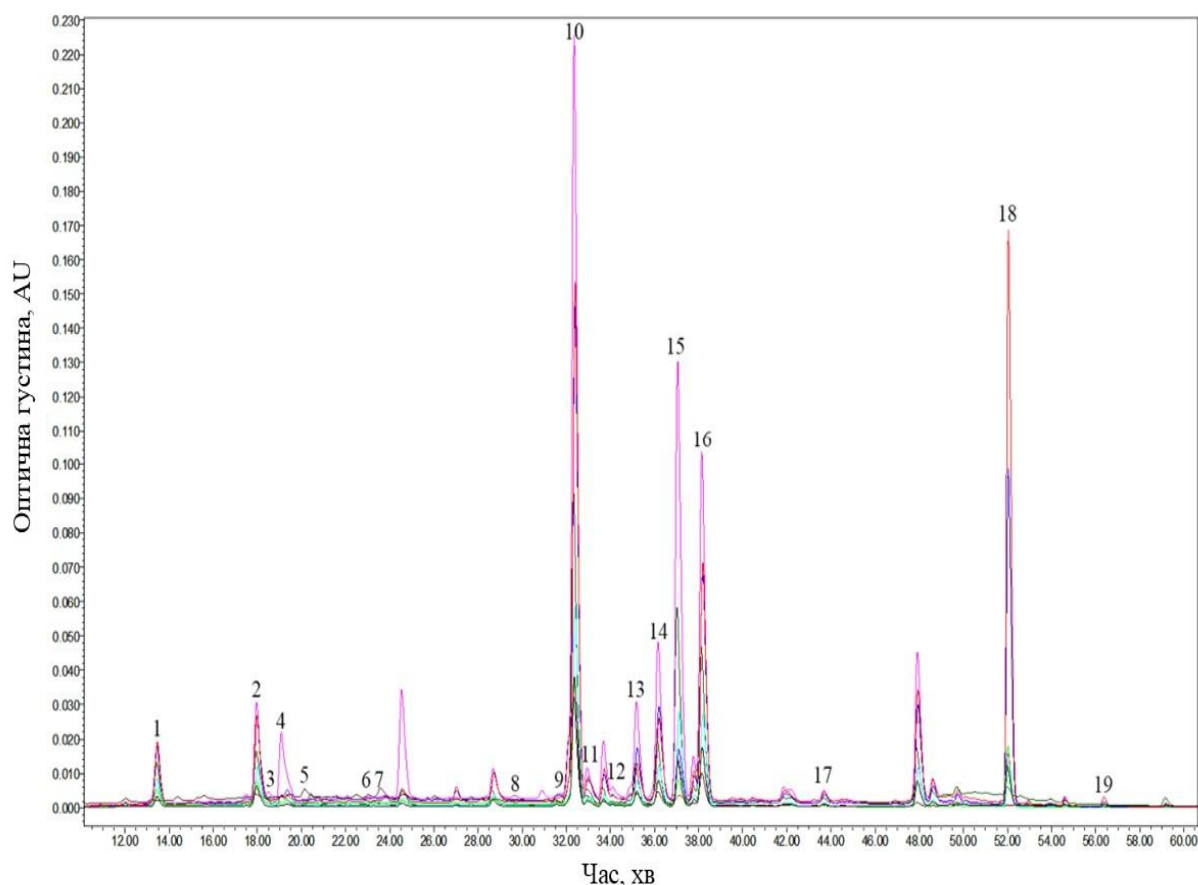


Рис. 4.3 Хроматографічні профілі фенольних сполук у екстрактах листя журавлини, отримані методом ВЕРХ-ФДМ за довжини хвилі 325 нм. Позначення піків: 1 – неохлорогенова кислота, 2 – хлорогенова кислота, 3 – (+)-катехін, 4 – 4-*O*-кофеїлхінна кислота, 5 – ціанідин-3-*O*-галактозид, 6 – (-)-епікатехін, 7 – ціанідин-3-*O*-арабінозид, 8 – проантоціанідин А1, 9 – *p*-кумарова кислота, 10 – гіперозид, 11 – ізокверцитрин, 12 – проантоціанідин А2, 13 – рейноутрин, 14 – кверцетин-3-*O*-арабінопіранозид, 15 – авікулярин, 16 – кверцитрин, 17 – кемпферол-3-*O*-рамнозид, 18 – кверцетин, 19 – кемпферол

У хроматографічних профілях екстрактів зафіксовано сигнали, що відповідають антоціановим глікозидам, флавонолам, флаван-3-олам, проантоціанідинам, а також гідроксикарбоновим і гідроксикоричним кислотам. Зокрема, у складі екстрактів присутні ціанідин-3-*O*-галактозид і ціанідин-3-*O*-арабінозид, а також флавонольні глікозиди – гіперозид, ізокверцитрин, рейноутрин, кверцетин-3-*O*-арабінопіранозид, авікулярин і кверцитрин.

Флавоноїдний компонент доповнюють аглікони кверцетин і кемпферол, а також кемпферол-3-*O*-рамнозид.

Фенольнокислотна фракція екстрактів представлена хлорогеновою, неохлорогеновою, 4-*O*-кафеойлхінною та *p*-кумаровою кислотами. У зоні флаван-3-олів виявлено (+)-катехін і (-)-епікатехін, а також проантоціанідини типів А1 та А2, що свідчить про збереження в екстрактах олігомерних фенольних структур.

На підставі отриманих хроматографічних профілів та ідентифікації окремих компонентів виконано кількісне визначення основних фенольних сполук в екстрактах листя журавлини методом ВЕРХ-ФДМ (табл. 4.4) [153].

Таблиця 4.4

**Фенольний склад екстрактів листя журавлини великоплодої,  
визначений методом ВЕРХ-ФДМ**

Фенольні сполуки	Вміст фенольних сполук у досліджуваних екстрактах, мкг/г							
	Е <sup>с</sup>	Е+В <sup>с</sup>	Е+А <sub>р</sub> <sup>в</sup>	Е+А <sub>л</sub> <sup>в</sup>	Е+Г <sub>л</sub> <sup>с</sup>	Е+Г <sup>с</sup>	Е+А <sub>с</sub> <sup>в</sup>	Е+Т <sup>в</sup>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ціанідин-3- <i>O</i> -галактозид	н.в.	н.к.	н.в.	н.в.	н.к.	н.к.	54 ± 9	105 ± 6
Ціанідин-3- <i>O</i> -арабінозид	н.в.	н.к.	н.в.	н.в.	н.к.	н.к.	129 ± 11	210 ± 4
Гіперозид	16125 ± 307	6848 ± 67	908 ± 6	8044 ± 104	10705 ± 109	6407 ± 241	5279 ± 20	5604 ± 13
Ізокверцитрин	1167 ± 35	399 ± 4	171 ± 5	480 ± 15	667 ± 2	397 ± 11	339 ± 4	404 ± 9
Рейноутрин	924 ± 64	1586 ± 15	188 ± 5	2007 ± 9	2542 ± 21	1499 ± 61	1084 ± 3	760 ± 14
Кверцетин-3- <i>O</i> -арабінопіранозид	5821 ± 58	2414 ± 23	243 ± 11	2903 ± 56	3911 ± 46	2306 ± 54	1801 ± 5	1548 ± 15
Авікулярин	12860 ± 407	3084 ± 27	595 ± 8	5930 ± 119	6446 ± 54	1712 ± 69	707 ± 14	67 ± 3
Кверцитрин	12333 ± 361	4703 ± 39	477 ± 15	5569 ± 113	7541 ± 87	4655 ± 102	3777 ± 6	3858 ± 36

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кверцетин	952 ± 67	2823 ± 46	103 ± 8	717 ± 10	2612 ± 67	4153 ± 107	4096 ± 11	6992 ± 42
Кемпферол-3-О- рамнозид	351 ± 13	110 ± 2	4 ± 1	175 ± 2	196 ± 5	111 ± 9	117 ± 2	119 ± 1
Кемпферол	50 ± 2	54 ± 1	9 ± 1	14 ± 1	52 ± 2	68 ± 3	49 ± 1	82 ± 1
Хлорогенова кислота	2356 ± 35	1117 ± 15	133 ± 3	685 ± 12	1599 ± 46	1222 ± 26	657 ± 10	672 ± 2
Неохлорогенова кислота	2497 ± 108	720 ± 17	47 ± 1	687 ± 6	1733 ± 64	1093 ± 17	687 ± 10	735 ± 21
4-О-кофеїлхінна кислота	1100 ± 45	834 ± 19	175 ± 1	649 ± 31	913 ± 8	863 ± 25	208 ± 2	235 ± 5
p-кумарова кислота	136 ± 10	70 ± 1	11 ± 1	17 ± 1	93 ± 6	71 ± 3	30 ± 2	16 ± 1
(+)-катехін	911 ± 42	415 ± 7	509 ± 2	666 ± 16	758 ± 6	484 ± 82	391 ± 23	383 ± 4
(-)-епікатехін	247 ± 3	1407 ± 55	190 ± 17	2147 ± 97	2166 ± 59	1540 ± 60	886 ± 12	444 ± 9
Проантоціанідин А1	1313 ± 26	1007 ± 69	139 ± 7	26 ± 67	1398 ± 93	1209 ± 36	447 ± 16	297 ± 19
Проантоціанідин А2	2053 ± 32	1689 ± 25	69 ± 3	2823 ± 6	4047 ± 74	2708 ± 49	1303 ± 16	902 ± 7
<u>Сумарний вміст</u>	<u>64196</u>	<u>29280</u>	<u>3971</u>	<u>34539</u>	<u>47379</u>	<u>30498</u>	<u>22041</u>	<u>23433</u>

Примітки:

1. <sup>с</sup> – результати наведено у мкг/г сухого екстракту;
2. <sup>в</sup> – результати наведено у перерахунку на в'язку масу екстракту;
3. н.в. – не виявлено;
4. н.к. – нижче межі кількісного визначення.

Кількісні дані ВЕРХ-ФДМ (табл. 4.4) засвідчили, що амінокислотна модифікація суттєво змінює фенольний профіль екстрактів листя журавлини великоплодої: за незмінної номенклатури визначуваних компонентів змінюються

їх співвідношення та загальна «видимість» для кількісного визначення. Найперше це проявляється у сумарному показнику: для немодифікованого екстракту Е він є максимальним (64196 мкг/г), тоді як у серії модифікованих зразків зменшується до 22041–47379 мкг/г. Така тенденція узгоджується з літературними відомостями про те, що при модифікації поліфенольних екстрактів можлива кон'югація з амінокислотами, що змінює частку вільних форм і, відповідно, впливає на результати кількісного визначення; аналогічний підхід і ефекти описані для модифікованих амінокислотами екстрактів листя чорниці високорослої (*Vaccinium corymbosum*) [100].

Найбільшу частку у фенольному профілі екстрактів становили флавонольні глікозиди. Так, у немодифікованому екстракті концентрація гіперозиду досягала  $16125 \pm 307$  мкг/г, тоді як у модифікованих зразках вона знижувалася до  $908 \pm 6$  мкг/г (Е + Ар). Аналогічна тенденція спостерігалася і для кверцитрину, вміст якого зменшувався з  $12333 \pm 361$  мкг/г у зразку Е до  $477 \pm 15$  мкг/г у зразку Е + Ар. Одночасно у ряді модифікованих екстрактів фіксували підвищення концентрацій агліконних форм флавоноїдів, зокрема кверцетину та кемпферолу (наприклад, до  $6992 \pm 42$  мкг/г кверцетину у зразку Е + Т), що може вказувати на перебіг процесів гідролізу глікозидних зв'язків під час амінокислотної модифікації, аналогічно до описаних раніше результатів [100].

Отже, результати кількісного аналізу свідчать, що амінокислотна модифікація екстрактів листя журавлини великоплодої зумовлює перерозподіл фенольних сполук між глікозидними та агліконними формами, а також зменшення вмісту гідроксикоричних кислот, що узгоджується з літературними даними щодо поліфенольного профілю журавлини та споріднених видів.

#### 4.5 Визначення кількісного вмісту груп біологічно активних речовин спектрофотометричними методами

За результатами спектрофотометричного аналізу встановлено кількісний вміст основних груп біологічно активних речовин у сухих екстрактах листя журавлини великоплодої – вихідному екстракті та екстракті, модифікованому аргініном.

Сума фенольних сполук у вихідному екстракті, визначена у перерахунку на галову кислоту методом прямої спектрофотометрії, становила  $17,16 \pm 0,29$  %. Застосування методу Фоліна–Чокальтеу дало дещо вищі значення цього показника ( $19,18 \pm 0,43$  %), що узгоджується з відомою здатністю даного методу реагувати з широким спектром фенольних сполук різної хімічної природи. У модифікованому екстракті вміст суми фенольних сполук був істотно нижчим і становив  $4,94 \pm 0,30$  % та  $7,59 \pm 0,56$  % залежно від використаного аналітичного підходу (методики – розд. 2, п. 2.7, 2.8).

Кількісний вміст суми флавоноїдів у вихідному екстракті у перерахунку на гіперозид становив  $4,94 \pm 0,46$  %, тоді як у перерахунку на рутин –  $4,01 \pm 0,26$  %, що свідчить про значну частку флавонолів у фенольному комплексі листя журавлини. У екстракті, модифікованому аргініном, вміст флавоноїдів зменшувався до  $3,19 \pm 0,45$  % та  $2,53 \pm 0,14$  % відповідно (методики – розд. 2, п. 2.9, 2.10).

Вміст суми похідних гідроксикоричних кислот у вихідному екстракті, визначений у перерахунку на хлорогенову кислоту методом стандарту, становив  $11,54 \pm 0,11$  %. Використання хромогенної реакції з натрію нітритом і натрію молібдатом дозволило зафіксувати вищі значення цього показника –  $13,59 \pm 0,63$  %. У модифікованому екстракті кількість гідроксикоричних кислот знижувалася до  $7,10 \pm 0,07$  % та  $8,10 \pm 0,37$  %, що свідчить про зміну стану цих сполук у модифікованій системі (методики – розд. 2, п. 2.11, 2.12).

Таблиця 4.5

**Кількісний вміст фенольних сполук у сухих екстрактах листя журавлини,  
визначений спектрофотометричними методами**

Аналітичний показник	Метод	Об'єкт дослідження (%, n = 5)	
		Е	Е + Аp
Сума фенольних сполук	у перерахунку на галову кислоту	17,16 ± 0,29	4,94 ± 0,30
	метод Фоліна–Чокальтеу	19,18 ± 0,43	7,59 ± 0,56
Сума флавоноїдів	у перерахунку на гіперозид	4,94 ± 0,46	3,19 ± 0,45
	у перерахунку на рутин	4,01 ± 0,26	2,53 ± 0,14
Сума похідних гідроксикоричних Кислот	у перерахунку на хлорогенову кислоту за методом стандарту	11,54 ± 0,11	7,10 ± 0,07
	у перерахунку на хлорогенову кислоту за питомим показником поглинання	13,59 ± 0,63	8,10 ± 0,37

Подібні тенденції зниження вмісту фенольних сполук у модифікованих екстрактах рослин роду *Vaccinium* відзначені й іншими дослідниками, що може бути пов'язано з утворенням комплексів або кон'югатів фенольних сполук з амінокислотами, зокрема аргініном, та зміною їх кількісного складу [100].

Отримані результати свідчать про високий рівень накопичення фенольних сполук у вихідному екстракті листя журавлини великоплодої та суттєві зміни його хімічного складу після модифікації аргініном [154].

## 4.6 Фармакологічне дослідження біологічної активності екстрактів з листя журавлини великоплодої

### 4.6.1 Антимікробна активність

Антимікробну активність екстракту з листя журавлини великоплодої та модифікованого екстракту з аргініном оцінювали за здатністю пригнічувати ріст стандартних тест-штамів мікроорганізмів, що відрізнялися за таксономічною належністю та біологічними властивостями (методика – розд. 2, п. 2.15; табл. 4.6).

Таблиця 4.6

### Антимікробна активність досліджуваних екстрактів з листя журавлини великоплодої

Тест-мікроорганізм	Діаметр зон інгібування росту, мм		
	Екстракт	Екстракт + аргінін	Препарат порівняння
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,3 ± 0,3	19,7 ± 0,3	19,0 ± 1,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,7 ± 0,3	16,7 ± 0,3	16,7 ± 0,3
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	14,3 ± 0,3*	15,7 ± 0,3	16,7 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,3 ± 0,3	15,3 ± 0,3	15,7 ± 0,3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	18,0 ± 0,0	20,3 ± 0,3*	18,7 ± 0,3
<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885	15,0 ± 0,0*	16,7 ± 0,3	16,7 ± 0,3

Примітка. \* – відмінності достовірні порівняно з препаратом порівняння «Інурек»,  $p \leq 0,05$ .

У ході дослідження встановлено, що як екстракт з листя журавлини, так і його комбінація з аргініном проявляли інгібувальний вплив щодо всіх досліджуваних мікроорганізмів. Діаметри зон затримки росту для *S. aureus* та *B. subtilis* були одними з найбільших і становили 18,3–18,0 мм для екстракту з листя журавлини та 19,7–20,3 мм для екстракту з аргініном, що свідчить про виражену чутливість цих грампозитивних бактерій. Для *E. coli*, основного уропатогену інфекцій сечовивідних шляхів, зони інгібування росту перебували в межах 15,7–16,7 мм залежно від складу зразка, що відповідає помірному рівню чутливості.

Антимікробна активність щодо *P. vulgaris* та *P. aeruginosa* характеризувалася формуванням зон затримки росту в межах 14,3–16,3 мм. При цьому для *P. vulgaris* та *C. albicans* спостерігалася статистично значуще зниження чутливості до екстракту з листя журавлини великоплодої порівняно з препаратом порівняння «Інурек». Водночас додавання аргініну до складу екстракту супроводжувалося підвищенням антимікробної активності щодо *B. subtilis*, що проявлялося достовірним збільшенням діаметра зони інгібування росту.

Загальний характер антимікробної активності узгоджується з літературними даними щодо здатності біологічно активних сполук журавлини великоплодої пригнічувати ріст грампозитивних і грамнегативних бактерій, що було продемонстровано для соку плодів цієї рослини [60]. Це може свідчити про збереження антимікробної активності біологічно активних сполук журавлини великоплодої при використанні різних видів рослинної сировини.

Результати проведеного дослідження показують, що екстракти з листя журавлини великоплодої характеризуються широким спектром антимікробної дії з формуванням зон затримки росту в діапазоні 14,3–20,3 мм, а поєднання екстракту з аргініном у ряді випадків посилює антимікробний ефект, що доцільно враховувати при подальших фармакологічних дослідженнях антимікробної активності екстрактів з листя журавлини великоплодої.

#### 4.6.2 Протизапальна активність на клітинних моделях шкіри *in vitro*

Під час дослідження протизапальної активності екстракту з листя журавлини великоплодої *in vitro* на клітинах шкіри людини оцінювали його вплив на життєздатність клітин, а також на секрецію ключових прозапальних цитокінів – ІЛ-6 та ІЛ-8, які відіграють провідну роль у формуванні та підтриманні запальної відповіді шкіри властивостями (методика – розд. 2, п. 2.16). З урахуванням структурно-функціональної організації шкіри та різної чутливості клітин епідермісу й дерми, аналіз було проведено з урахуванням відповіді кератиноцитів і фібробластів.

За результатами SRB-аналізу виявлено, що екстракт чинить дозозалежний вплив на життєздатність клітин, причому характер цієї дії відрізнявся залежно від типу клітин. Кератиноцити виявилися більш чутливими до дії екстракту: статистично значуще зниження життєздатності клітин спостерігалось, починаючи з концентрації 62,5 мкг/мл, що вказує на нижчий поріг цитотоксичності для клітин епідермісу (рис. 4.4).

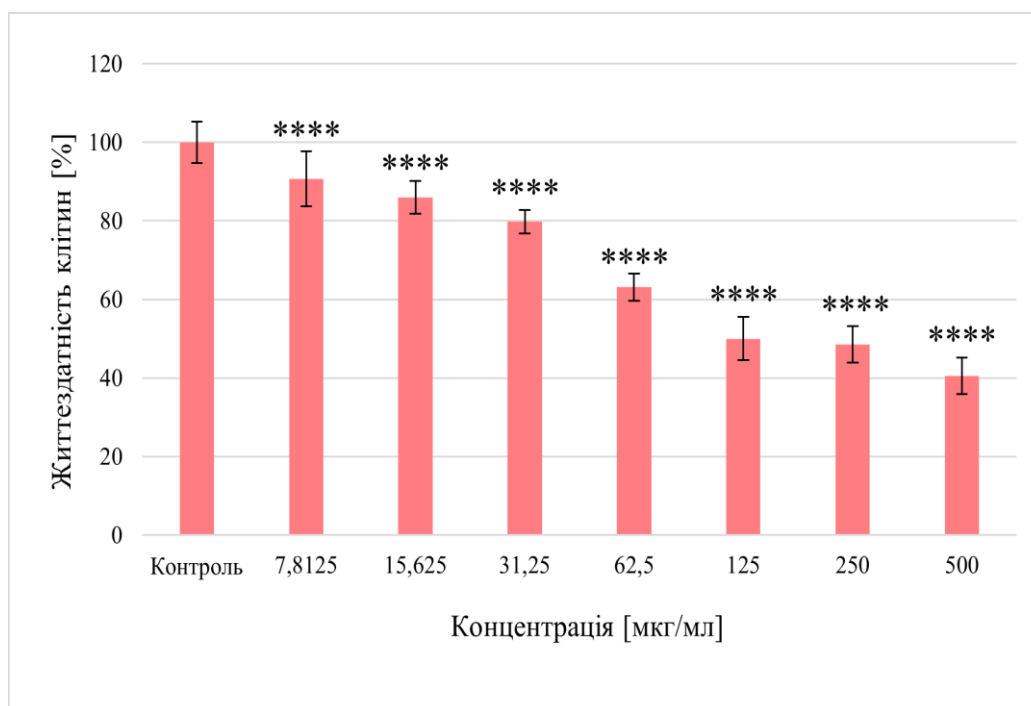


Рис. 4.4 Вплив екстракту на життєздатність кератиноцитів людини

Примітка. \*\*\*\* – відхилення достовірно щодо контрольної стимульованої групи ( $p \leq 0,0001$ ).

У фібробластах людини екстракт у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій (до 500 мкг/мл) не спричиняв вираженого цитотоксичного ефекту, оскільки показники життєздатності клітин залишалися на рівні, близькому до контрольного (рис. 4.5). Це свідчить про добру цитосумісність екстракту з клітинами дерми та наявність безпечного концентраційного діапазону для подальшої оцінки біологічної активності.

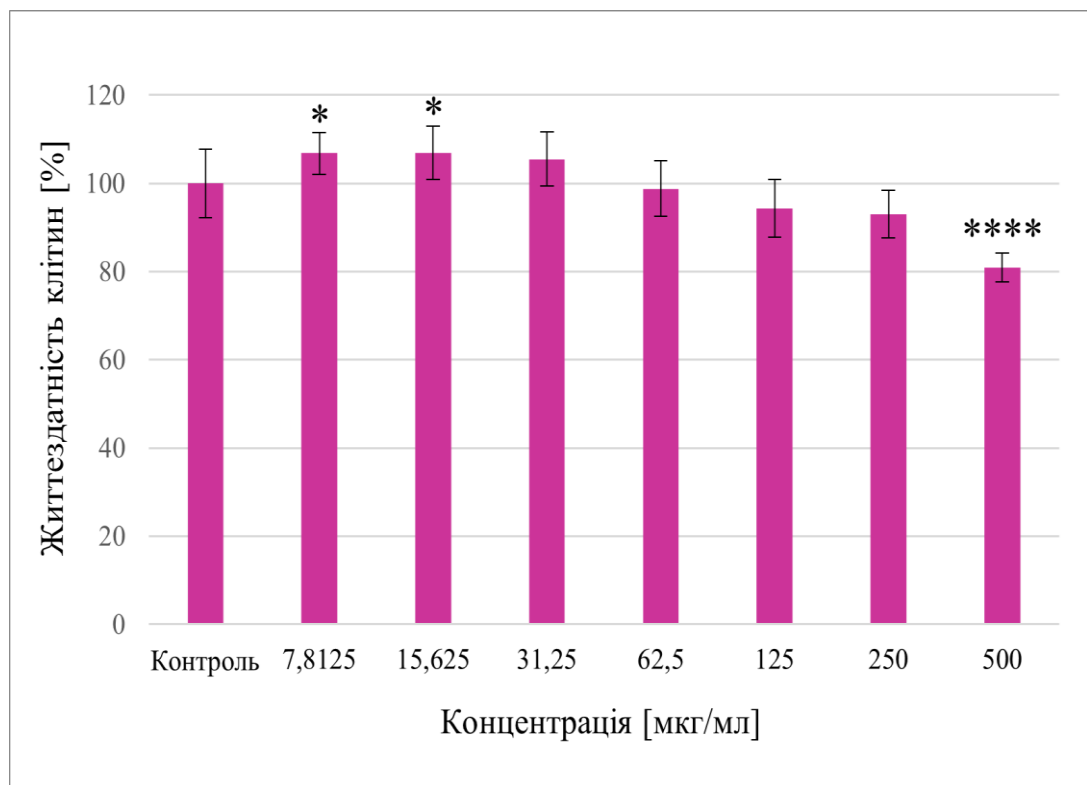


Рис. 4.5 Вплив екстракту з листя журавлини великоплодої на життєздатність фібробластів людини

Примітки:

1. \* – відхилення достовірно щодо контрольної групи ( $p \leq 0,05$ );
2. \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ .

Отримані результати дозволили визначити концентрації, у межах яких протизапальна активність екстракту може оцінюватися без впливу неспецифічної цитотоксичної дії.

Після оцінки життєздатності клітин методом SRB подальший аналіз був спрямований на дослідження впливу екстракту з листя журавлини великоплодої на секрецію прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8 методом імуноферментного аналізу. Стимуляція клітин прозапальними агентами призводила до суттєвого підвищення рівнів обох цитокінів порівняно з нестимульованим контролем, що підтверджує формування запальної відповіді *in vitro* та коректність використаної експериментальної моделі.

У кератиноцитах екстракт впливав на секрецію ІЛ-6, демонструючи поступове та статистично значуще зниження його рівня зі зростанням концентрації, з найбільш вираженим ефектом у діапазоні 31,25–62,5 мкг/мл (рис. 4.6).

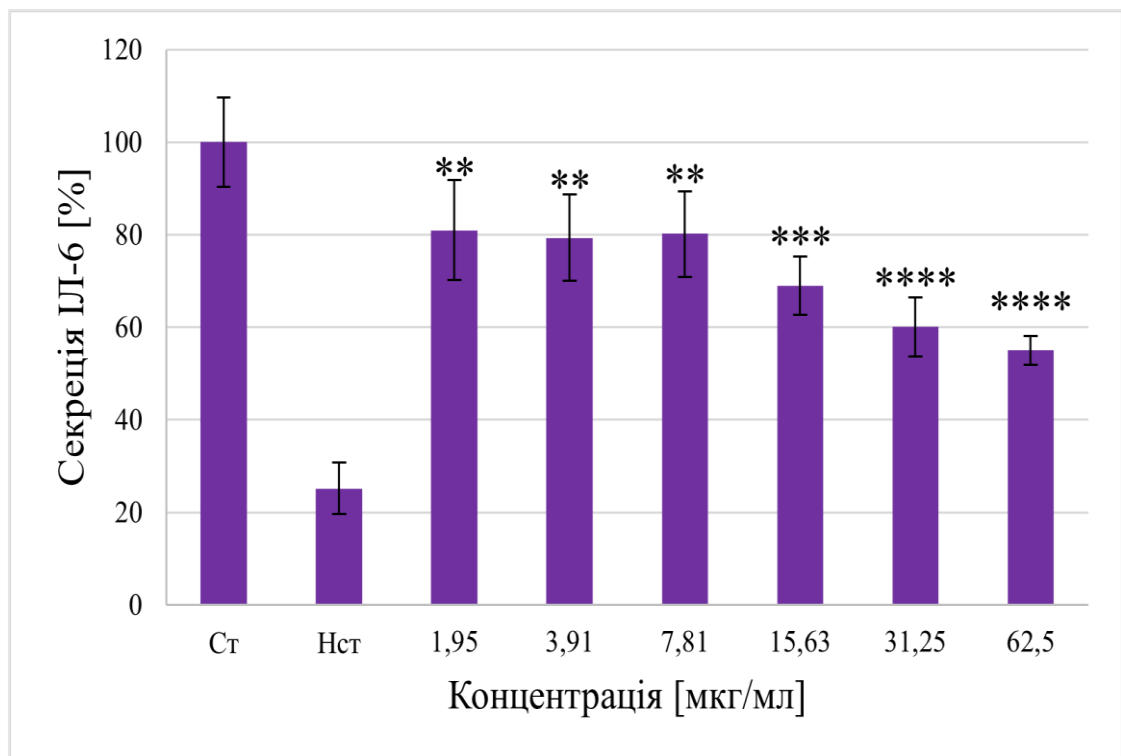


Рис. 4.6 Зміни секреції інтерлейкіну-6 кератиноцитами людини під впливом екстракту листя журавлини великоплодої

Примітки:

1. \*\* – відхилення достовірно щодо контрольної стимульованої групи ( $p \leq 0,01$ );
2. \*\*\* –  $p \leq 0,001$ ;
3. \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ .

Натомість секреція ІЛ-8 у кератиноцитах залишалася близькою до рівня стимульованого контролю на низьких і середніх концентраціях екстракту та знижувалася істотно лише при максимальній досліджуваній концентрації (рис. 4.7). При цьому саме в цьому концентраційному діапазоні також фіксувалося помірне зниження життєздатності клітин, що вказує на необхідність обережної інтерпретації змін ІЛ-8 з урахуванням цитотоксичного компоненту.

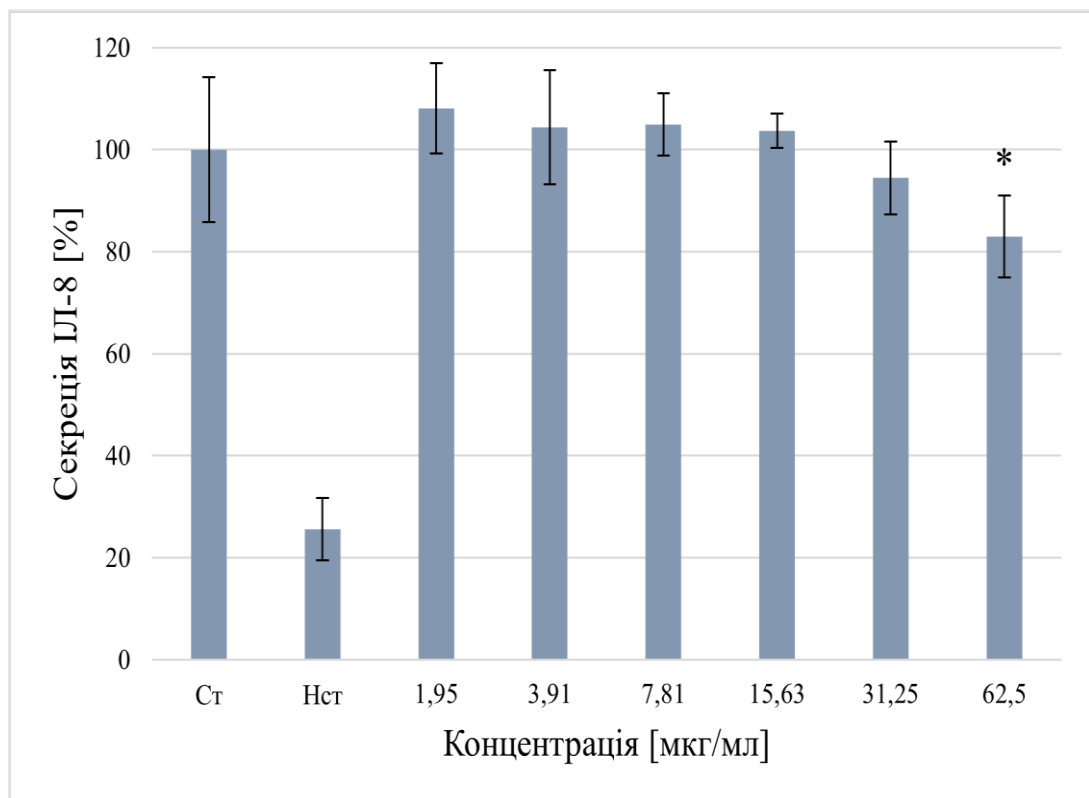


Рис. 4.7 Регуляція секреції інтерлейкіну-8 кератиноцитами людини за дії екстракту листа журавлини великоплодої

Примітка. \* – відхилення достовірно щодо контрольної стимульованої групи ( $p \leq 0,05$ ).

У фібробластах людини екстракт проявляв чітку концентраційно-залежну протизапальну дію. Секреція ІЛ-6 поступово знижувалася зі зростанням концентрації екстракту та досягала статистично значущого зменшення у діапазоні 62,5–250 мкг/мл, тоді як на нижчих концентраціях ефект був помірним або відсутнім (рис. 4.8).

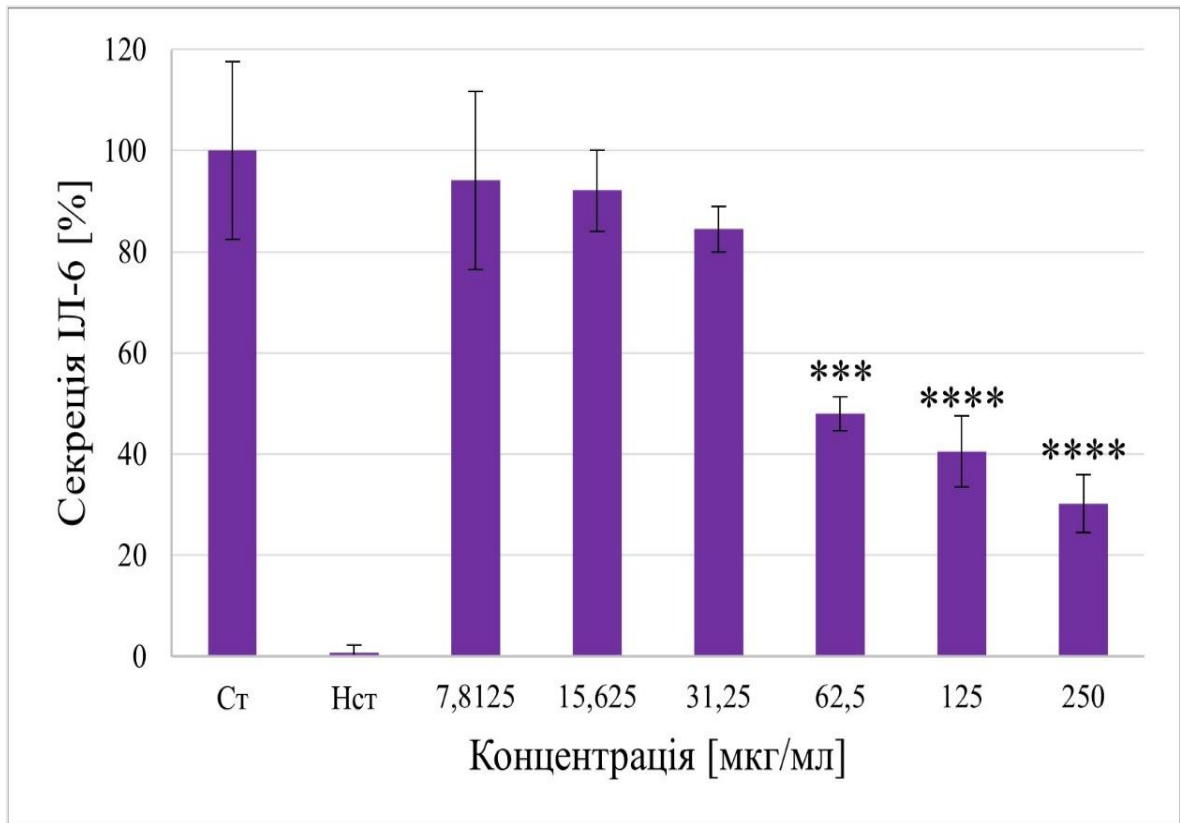


Рис. 4.8 Модуляція секреції інтерлейкіну-6 фібробластами людини під дією екстракту листя журавлини великоплодої

Примітки:

1. \*\*\* – відхилення достовірно щодо контрольної стимульованої групи ( $p \leq 0,001$ );
2. \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ .

Аналогічна тенденція спостерігалася й для ІЛ-8, проте зниження його секреції було менш вираженим на середніх концентраціях і ставало статистично значущим переважно при 125–250 мкг/мл (рис. 4.9). Важливо, що інгібування продукції обох цитокінів у фібробластах відбувалося за умов збереженої життєздатності клітин, що свідчить про реалізацію протизапального ефекту екстракту незалежно від цитотоксичної дії.

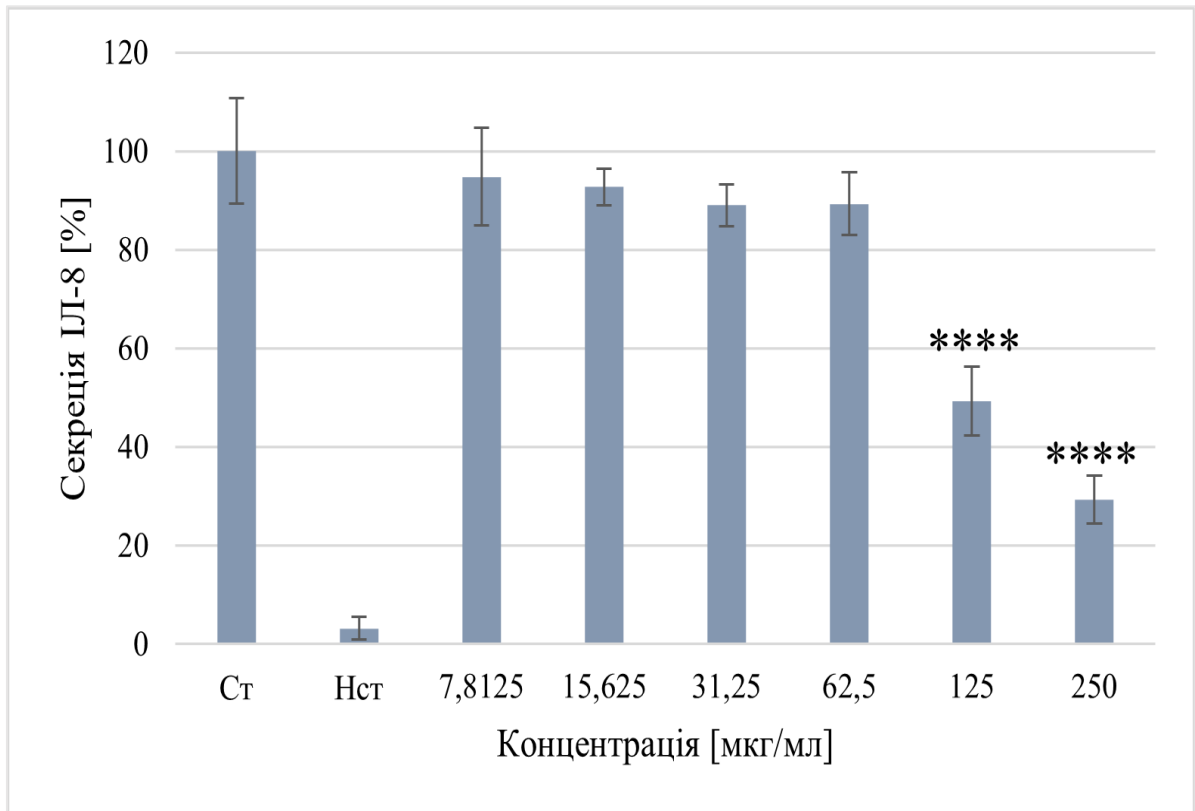


Рис. 4.9 Вплив екстракту листя журавлини великоплодої на продукцію інтерлейкіну-8 фібробластами людини

Примітка. \*\*\*\* – відхилення достовірно щодо контрольної стимульованої групи ( $p \leq 0,0001$ ).

Отже, результати ІФА узгоджуються з даними SRB-аналізу та свідчать про те, що екстракт з листя журавлини великоплодої реалізує протизапальний ефект *in vitro* з вираженою клітинно-специфічною та цитокін-специфічною дією: у кератиноцитах протизапальний ефект проявляється переважно через модуляцію секреції ІЛ-6, а зниження ІЛ-8 є обмеженим і з'являється лише на високих концентраціях екстракту, тоді як у фібробластах спостерігається концентраційно-залежне пригнічення як ІЛ-6, так і ІЛ-8 без втрати життєздатності клітин.

#### 4.6.3 Протизапальна активність на моделі карагенін-індукованого набряку

Аналіз протизапальної активності екстрактів листя журавлини великоплодої, проведений на моделі карагенін-індукованого набряку (методика – розд. 2, п. 2.17),

показав відмінності між дослідними групами та контрольною патологією (табл. 4.7). Під час дослідження встановлено, що у тварин групи контрольної патології після введення карагеніну відбувалося поступове наростання набряку, який зберігався протягом усього періоду спостереження, що підтверджує адекватність моделі гострого запалення.

Таблиця 4.7

**Динаміка змін об'єму набряку та рівень пригнічення ексудації після введення досліджуваних речовин**

Група тварин	Доза, мг/кг	Початковий об'єм	Показники через певний час після введення карагеніну			
			0 год	1 год	2 год	3 год
Контроль (патологія)	–	1,62 ± 0,02	2,40 ± 0,01	2,56 ± 0,02	2,58 ± 0,02	2,61 ± 0,01
Е	100	1,60 ± 0,01	2,25 ± 0,05 (18 %)*	2,33 ± 0,02 (23 %)*	2,37 ± 0,01 (20 %)*	2,41 ± 0,03 (19 %)*
Е + Ар	100	1,59 ± 0,02	2,17 ± 0,02 (26 %)*	2,20 ± 0,02 (35 %)*	2,31 ± 0,03 (25 %)*	2,35 ± 0,04 (23 %)*
Диклофенак натрію	8	1,36 ± 0,01	1,84 ± 0,02 (73 %)*	1,93 ± 0,02 (68 %)*	1,96 ± 0,02 (65 %)*	2,04 ± 0,04 (59 %)*

Примітка. \* – різниця до препарату порівняння ( $p \leq 0,05$ ).

На цьому тлі введення екстрактів листя журавлини великоплодої сприяло статистично значущому зменшенню вираженості ексудативної реакції. Немодифікований екстракт забезпечував пригнічення набряку на рівні 18 %, 23 %, 20 % та 19 % через 1, 2, 3 та 4 години відповідно, тоді як екстракт, модифікований аргініном, демонстрував більш виражений ефект – 26 %, 35 %, 25 % та 23 % у ті ж часові проміжки.

Максимальна активність обох екстрактів спостерігалася на другій годині після введення флогогену. Така динаміка корелює з відомими етапами розвитку запальної реакції: у перші 0,5–1,5 години провідну роль відіграють гістамін і

серотонін, у проміжку 1,5–2,5 години активними стають кініни, тоді як простагландини починають домінувати з 2,5 години і далі [155]. Саме тому друга година експерименту, коли кінінова ланка запалення є найбільш активною, є часовим вікном для максимального прояву дії антиексудативних засобів.

Факт, що модифікований екстракт з аргініном значно ефективніше знижував вираженість набряку на ранніх етапах розвитку запальної реакції (1–2 години), свідчить про потенційний вплив цієї композиції саме на ранньо-медіаторні механізми запалення, насамперед гістамін- та брадикінінзалежні шляхи. Це дозволяє припустити наявність синергії між аргініном та фенольними сполуками екстракту, зокрема похідними гідроксикоричних кислот, що може підсилювати їх біологічну активність та модулювати ранні етапи розвитку ексудативної реакції.

Для порівняння, диклофенак натрію забезпечував значно більш інтенсивне пригнічення запалення – 73 %, 68 %, 65 % та 59 % протягом 1–4 годин, що відповідає його фармакологічному профілю потужного інгібітора циклооксигенази та підтверджує валідність використаної моделі як чутливої до тестування протизапальних агентів.

У сукупності результати свідчать, що екстракти листя журавлини великоплодої, особливо композиція з аргініном, проявляють помірний, але стабільний антиексудативний ефект із піком активності на ранніх етапах запальної реакції [156, 157], що вказує на перспективність подальших досліджень.

#### 4.6.4 Дослідження гострої токсичності

Дослідження гострої токсичності екстракту з листя журавлини великоплодої проведено для оцінки його безпечності перед подальшим вивченням фармакологічної активності (методика – розд. 2, п. 2.18). У групі контрольної патології протягом перших двох діб експерименту було зафіксовано загибель двох тварин, що становило 33 % від загальної кількості мишей у цій групі. Водночас у всіх експериментальних групах, яким вводили екстракт з листя журавлини

великоплодої, летальних випадків не спостерігалось протягом усього періоду спостереження [153].

Крім того, у тварин, які отримували досліджуваний екстракт, не було виражених змін поведінки, порушень координації рухів, патологічних змін стану шкіри та слизових оболонок або інших клінічних проявів гострої токсичності. Отримані результати свідчать про відсутність вираженої гострої токсичної дії сухого екстракту з листя журавлини великоплодої при внутрішньошлунковому введенні та підтверджують доцільність подальшого дослідження його фармакологічних властивостей.

#### 4.6.5 Гепатопротекторна активність

Досліджувані екстракти листя журавлини великоплодої та їх амінокислотні модифікації продемонстрували виражену гепатопротекторну активність у моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту (методика – розд. 2, п. 2.19). Такий ефект узгоджується з відомими патобіохімічними механізмами токсичної дії  $CCl_4$ , які пов'язані з утворенням трихлорметильних радикалів та інтенсивним запуском ліпопероксидації. Гепатопротекторний ефект підтверджувався як змінами коефіцієнта маси печінки, так і корекцією біохімічних маркерів цитолізу (табл. 4.8).

*Таблиця 4.8*

#### **Коефіцієнт маси печінки (КМП) у тварин із гострим тетрахлорметановим гепатитом під впливом екстракту з листя журавлини великоплодої та амінокислотних комбінацій**

Група тварин	Маса тіла, г	Маса печінки, г	КМП, %
1	2	3	4
Інтактні тварини	174,2 ± 11,7	6,1 ± 0,4	3,5 ± 0,1
Контроль патології ( $CCl_4$ )	235,0 ± 15,9	12,0 ± 0,6	5,1 ± 0,5 *
Екстракт листя журавлини	210,0 ± 9,4	8,9 ± 0,7	4,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
Екстракт + валін	233,3 ± 8,6	8,9 ± 0,6	3,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>
Екстракт + аргінін	218,3 ± 12,3	8,1 ± 0,7	3,7 ± 0,2 <sup>ab</sup>

1	2	3	4
Екстракт + аланін	221,7 ± 12,3	9,3 ± 0,9	4,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
Екстракт + гліцин	191,7 ± 7,9	7,9 ± 0,6	4,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
Екстракт + гістидин	210,0 ± 9,6	8,4 ± 0,5	4,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>
Екстракт + аспарагінова кислота	225,0 ± 11,0	9,2 ± 1,1	4,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
Екстракт + таурин	226,7 ± 12,7	9,2 ± 0,7	4,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>
«Силібор»	216,7 ± 6,4	8,6 ± 0,5	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>

Примітки:

1. \* –  $p \leq 0,05$  відносно інтактної групи;
2. <sup>a</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно контрольної патології;
3. <sup>b</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи «Силібор».

У тварин контрольної патології маса печінки зростала на 45,17 % порівняно з інтактною групою, що є типовим проявом токсичного набряку та запального ураження гепатоцитів після дії  $CCl_4$ . На тлі введення екстракту листя журавлини, особливо його модифікації з аргініном та валіном, цей показник достовірно зменшувався – відповідно на 27,2 % та 25,64 % і практично наближався до значень інтактних тварин.

Для порівняння, препарат порівняння «Силібор» знижував КМП на 22,5 %, що свідчить про дещо вищу ефективність саме амінокислотно модифікованих форм екстракту. Інші композиції (з гліцином, гістидином, аланіном, аспарагіновою кислотою та таурином) забезпечували зниження показника у межах 17,8–21,92 %, тобто на рівні, близькому до «Силібору».

Біохімічні маркери ушкодження печінки наведено в таблиці 4.9. Одноразове введення тетрахлорметану призводило до різко вираженого цитолітичного синдрому, що відповідає класичним уявленням про порушення цілісності мембран гепатоцитів під впливом радикальних метаболітів  $CCl_4$  [158]. У контрольній патології активність аланінамінотрансферази зростала у 3,37 раза, а аспартатамінотрансферази – у 2,42 раза порівняно з інтактною групою. Паралельно відзначалося суттєве підвищення рівня продуктів пероксидного окиснення ліпідів:

у сироватці – у 1,85 раза, у гомогенаті печінки – у 2,51 раза, що цілком відповідає перебігу оксидативного стресу при  $CCl_4$ -індукованому ураженні печінки.

Таблиця 4.9

**Біохімічні показники сироватки крові та гомогенату печінки щурів за умов  $CCl_4$ -індукованого гепатиту та під впливом екстрактів**

Група	АлАТ, мкмоль/год·мл	АсАТ, мкмоль/год·мл	ТБК- реактанти, сироватка, нмоль/мл	ТБК- реактанти, печінка, нмоль/мл
Інтакт	0,76 ± 0,05	0,96 ± 0,06	3,23 ± 0,12	2,45 ± 0,09
Контроль патології	2,56 ± 0,11 *	2,32 ± 0,11 *	5,96 ± 0,28 *	6,15 ± 0,26 *
Екстракт	1,28 ± 0,04 <sup>ab</sup>	1,36 ± 0,06 <sup>abc</sup>	4,21 ± 0,20 <sup>abc</sup>	3,64 ± 0,13 <sup>ab</sup>
Екстракт + валін	0,96 ± 0,04 <sup>abc</sup>	1,09 ± 0,05 <sup>abc</sup>	3,52 ± 0,16 <sup>abc</sup>	2,90 ± 0,14 <sup>abc</sup>
Екстракт + аргінін	0,85 ± 0,06 <sup>abc</sup>	1,04 ± 0,05 <sup>abc</sup>	3,38 ± 0,12 <sup>abc</sup>	2,76 ± 0,15 <sup>abc</sup>
Екстракт + аланін	1,31 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,34 ± 0,05 <sup>abc</sup>	4,15 ± 0,21 <sup>abc</sup>	3,78 ± 0,17 <sup>abc</sup>
Екстракт + гліцин	1,26 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,30 ± 0,05 <sup>abc</sup>	4,01 ± 0,22 <sup>ab</sup>	3,80 ± 0,17 <sup>abc</sup>
Екстракт + гістидин	1,06 ± 0,06 <sup>abc</sup>	1,16 ± 0,06 <sup>abc</sup>	3,71 ± 0,16 <sup>abc</sup>	3,24 ± 0,17 <sup>abc</sup>
Екстракт + аспарагінова кислота	1,21 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,28 ± 0,07 <sup>ab</sup>	3,97 ± 0,26 <sup>ab</sup>	3,65 ± 0,17 <sup>ab</sup>
Екстракт + таурин	1,10 ± 0,04 <sup>abc</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>abc</sup>	3,80 ± 0,17 <sup>abc</sup>	3,10 ± 0,17 <sup>abc</sup>
«Силібор»	1,27 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,24 ± 0,05 <sup>ab</sup>	3,90 ± 0,16 <sup>ab</sup>	3,57 ± 0,16 <sup>ab</sup>

Примітки:

1. \* –  $p \leq 0,05$  відносно інтактної групи;
2. <sup>a</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно контрольної патології;
3. <sup>b</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи «Силібор»;
4. <sup>c</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно різних амінокислотних комбінацій.

Уведення екстрактів листя журавлини та їх амінокислотних форм сприяло суттєвому зниженню активності цитолітичних ферментів. Найбільш виражений

гепатопротекторний ефект спостерігався в групах, які отримували композиції з аргініном, валіном та гістидином: рівні АлАТ та АсАТ зменшувалися до значень, близьких до показників тварин, які отримували «Силібор». Антицитолітична дія аргініну узгоджується з його здатністю впливати на NO-синтазний шлях і зменшувати тяжкість токсичного ушкодження клітин [159].

Амінокислотні модифікації також ефективно пригнічували пероксидне окиснення ліпідів. Композиції екстракту з листя журавлини з аргініном та екстракту з валіном зменшували рівень ТБ-реактивів у гомогенаті печінки майже до показників групи «Силібор», що узгоджується з літературними даними про високу антиоксидантну активність поліфенольних комплексів ягід [7].

Узагальнюючи результати, можна зазначити, що сухий екстракт листя журавлини та його амінокислотні похідні мають виражену гепатопротекторну активність, яка реалізується через нормалізацію ферментативних маркерів цитолізу, зменшення ліпопероксидації, стабілізацію клітинних мембран та покращення морфофункціонального стану печінки [153, 160].

#### 4.6.6 Гіпоглікемічна активність

Для оцінки гіпоглікемічної та інсуліносенсibiliзуючої дії екстракту з листя журавлини великоплодої та його амінокислотної модифікації з аргініном проведено експериментальні дослідження на моделі інсулінорезистентності, індукованої фруктозо-збагаченою дієтою (методика – розд. 2, п. 2.20).

Упродовж перших п'яти тижнів експерименту у всіх тварин, які отримували фруктозозбагачений раціон, відзначали односпрямоване збільшення маси тіла (рис. 4.10), причому ці значення достовірно перевищували показники інтактної групи. Найбільш виражений приріст маси тіла, розрахований у відсотках від початкових значень, спостерігався у щурів з індукованою інсулінорезистентністю без лікування (група ІР).

На подальшому етапі дослідження (5–7-й тижні) у тварин групи ІР фіксували інтенсивне подальше зростання середньої маси тіла, що свідчить про

прогресування метаболічних порушень за умов високофруктозної дієти. Водночас у групах, яким на тлі фруктозного навантаження вводили досліджувані препарати, спостерігалось уповільнення темпів приросту маси тіла, що вказує на часткову корекцію метаболічних змін, індукованих високофруктозною дієтою.

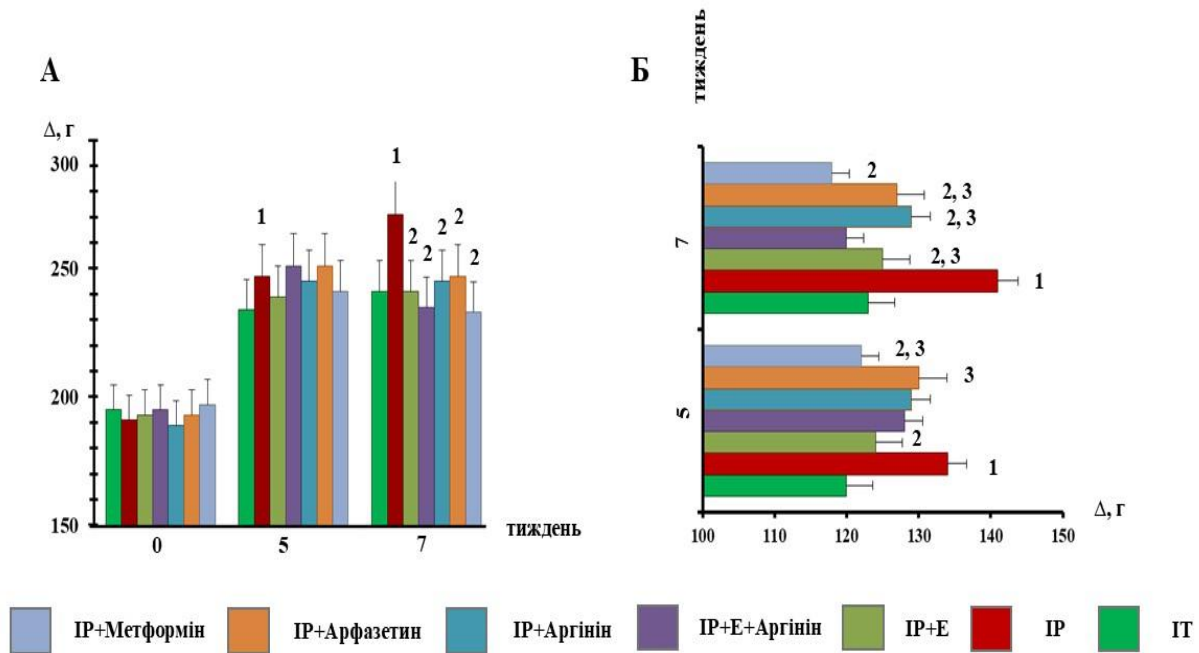


Рис. 4.10 Динаміка змін маси тіла щурів за умов високофруктозної дієти та введення досліджуваних препаратів (А – абсолютні значення; Б – приріст маси тіла у 5-й та 7-й тижні експерименту)

Примітки:

- <sup>1</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IT,  $p \leq 0,05$ ;
- <sup>2</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP,  $p \leq 0,05$ ;
- <sup>3</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP + E + Аргінін,  $p \leq 0,05$ .

Пероральний глюкозотолерантний тест, проведений після двотижневого введення досліджуваних засобів, засвідчив виражену позитивну динаміку у корекції інсулінорезистентності. У тварин з індукованою IP рівень глюкози натще був достовірно вищим порівняно з інтактною групою, у якій цей показник залишався практично незмінним від початку дослідження. Застосування

поліфенольного екстракту разом із аргініном, так само як і «Метформіну-Тева», сприяло помітному зниженню базальної глікемії — відповідно на 22,6 % та 26,7 % відносно показників ІР-групи (рис. 4.11, А).

Оскільки ключовим завданням ОГТТ є аналіз глікемічної відповіді на навантаження глюкозою, особливу увагу було приділено динаміці змін цього показника. У тварин з інсулінорезистентністю виявлено істотне порушення толерантності до глюкози: через 120 хв після навантаження концентрація глюкози в крові перевищувала значення інтактної групи на 18,6 %, що свідчить про зниження ефективності периферичного захвату глюкози та уповільнення процесів її утилізації (рис. 4.11, А).

Введення досліджуваних препаратів достовірно обмежувало розвиток гіперглікемії після глюкозного навантаження. Уже на 90-й хвилині експерименту у тварин, які отримували комбінацію поліфенольного екстракту з аргініном, рівень глюкози був значуще нижчим порівняно з групою ІР. У цілому комбінований препарат Е + Аргінін продемонстрував більш виражену здатність запобігати розвитку гіперглікемічного піку, ніж «Арфазетин», і за ефективністю наближався до дії «Метформіну-Тева» протягом усього періоду тесту, що узгоджується з результатами аналізу площі під глікемічною кривою.

Інтегральна оцінка глікемічної відповіді підтвердила зазначені тенденції: у групі ІР + Е + Аргінін площа під кривою становила 786 ммоль/л×хв, що було на 19,4 % менше порівняно з нелікованою ІР-групою та на 4,8 % нижче, ніж у тварин, які отримували «Арфазетин» (рис. 4.11, Б). Це вказує на здатність модифікованого екстракту ефективно покращувати толерантність до глюкози та зменшувати загальне гіперглікемічне навантаження за умов інсулінорезистентності.

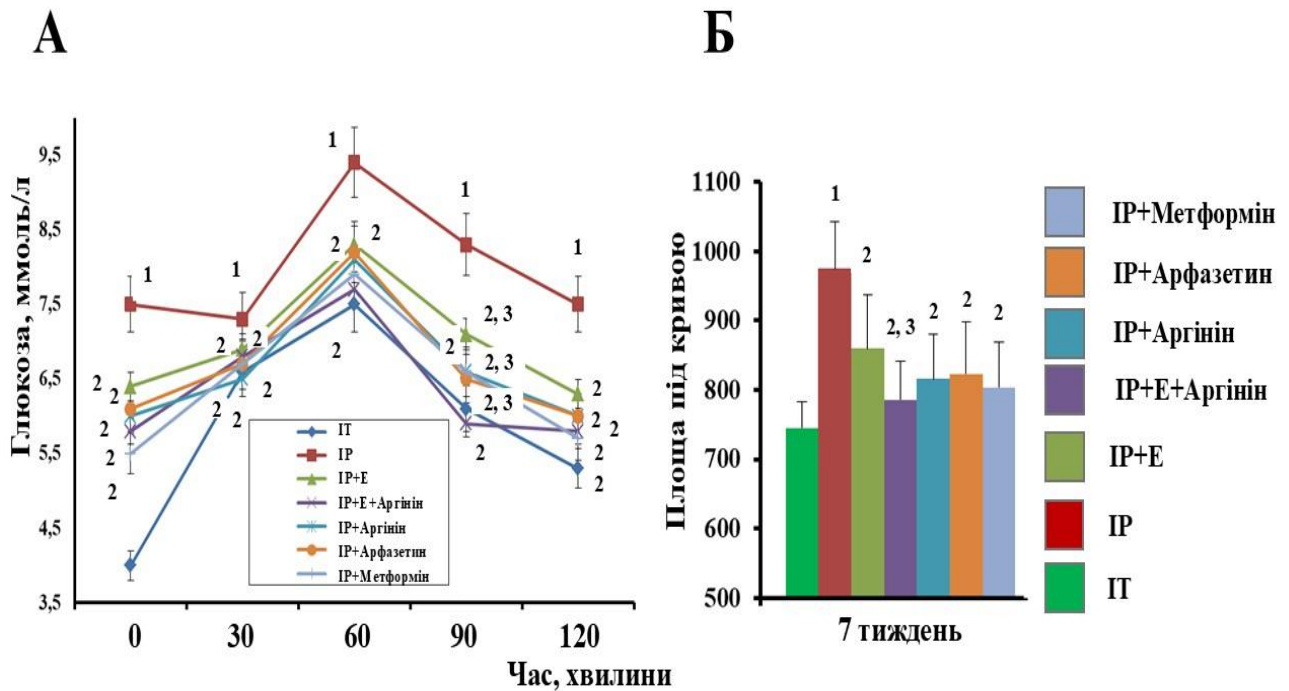


Рис. 4.11 Вплив досліджуваних екстрактів та препаратів порівняння на динаміку постнавантажувальної глікемії (А) та площу під глікемічною кривою (В) у моделі інсулінорезистентності

Примітки:

- <sup>1</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IT,  $p \leq 0,05$ ;
- <sup>2</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP,  $p \leq 0,05$ ;
- <sup>3</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP+E+Аргінін,  $p \leq 0,05$ .

Аналіз індексу НОМА-IR (рис. 4.12) показав, що у щурів, які перебували на фруктозозбагатеному раціоні, цей показник був достовірно підвищеним порівняно з інтактними тваринами, що підтверджує формування інсулінорезистентного стану. Введення поліфенольного екстракту, особливо у поєднанні з аргініном, сприяло частковій нормалізації рівня інсуліну та відповідному зниженню НОМА-IR до значень, наближених до контрольних. За ефективністю коригувальної дії зазначені ефекти були співставними з дією препаратів порівняння, що свідчить про виражений інсуліносенсibiliзуювальний потенціал досліджуваних засобів.

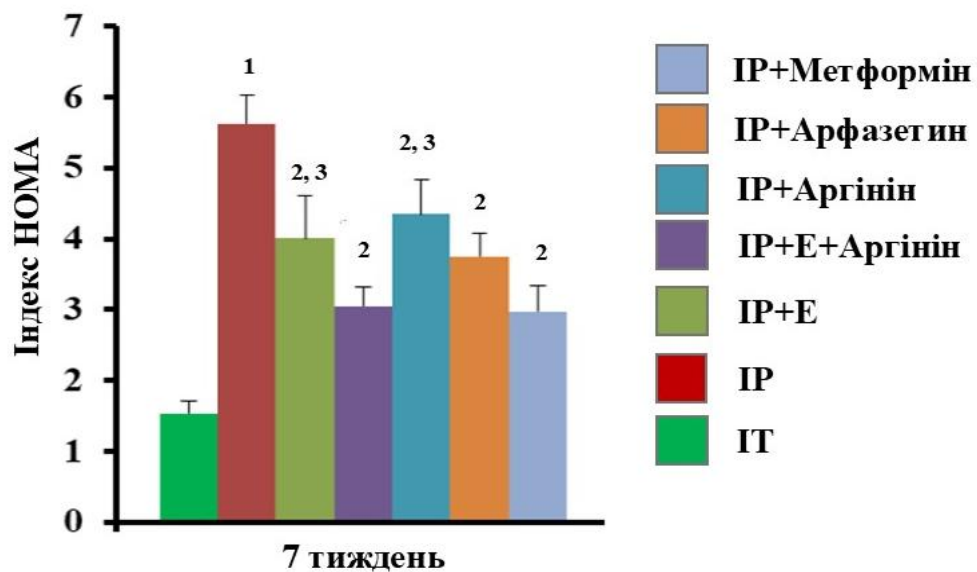


Рис. 4.12 Вплив поліфенольного екстракту та його амінокислотної модифікації на індекс НОМА-IR у щурів з інсулінорезистентністю

Примітки:

1. <sup>1</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IT,  $p \leq 0,05$ ;
2. <sup>2</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP,  $p \leq 0,05$ ;
3. <sup>3</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи IP + E + Аргінін,  $p \leq 0,05$ .

Стан інсулінової чутливості периферичних тканин оцінювали з використанням тесту толерантності до інсуліну (ІТТ). Аналіз отриманих результатів показав, що у щурів із сформованою інсулінорезистентністю відзначалося суттєве ослаблення відповіді на екзогенний інсулін порівняно з інтактними тваринами, що підтверджує наявність порушень інсулінового сигналіngu (рис. 4.13).

У тварин, які отримували комбінацію поліфенольного екстракту з аргініном, зниження рівня глюкози під час ІТТ (оцінене за площею під кривою) було достовірно меншим, ніж у групі IP, і наближалось до показників інтактної групи. Водночас різниця між IP + E + Аргінін та IP + Метформін була статистично незначущою, що свідчить про зіставну ефективність їх коригувальної дії (рис. 4.13, Б).

Детальніший аналіз динаміки глікемії під час проведення ІТТ показав, що у щурів групи ІР через 30 хв після початку тесту концентрація глюкози знижувалася лише на 19,7 %, що на 27,4 % менше порівняно з інтактними тваринами. Натомість у групах, які отримували референтні препарати, інсулінова відповідь була більш вираженою: коефіцієнт чутливості до інсуліну досягав 31,9 % та 41,2 % відповідно. Комбіноване введення екстракту з аргініном забезпечувало часткове відновлення цього показника до значень, близьких до фізіологічних.

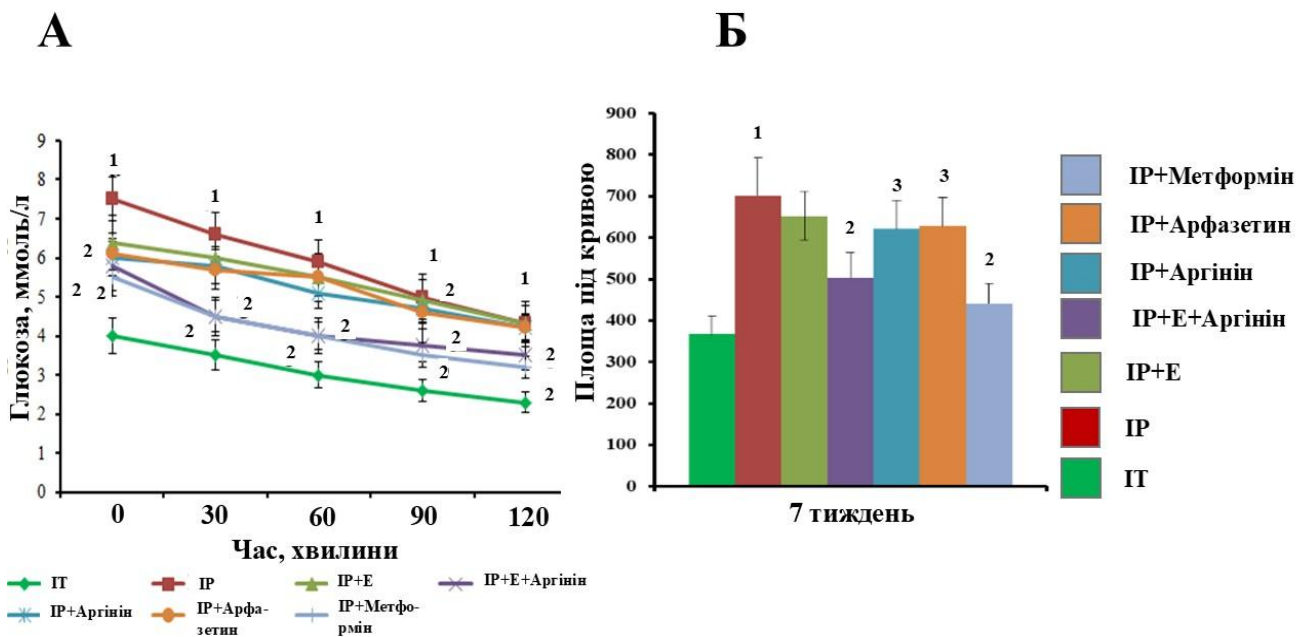


Рис. 4.13 Результати тесту толерантності до інсуліну (ІТТ) та площі під кривою у щурів на 7-му тижні експерименту. А – динаміка рівня глюкози крові під час ІТТ (ммоль/л); Б – площа під кривою для ІТТ, ммоль/л × 120 хв

Примітки:

1. <sup>1</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи ІТ,  $p \leq 0,05$ ;
2. <sup>2</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи ІР,  $p \leq 0,05$ ;
3. <sup>3</sup> – вказує на значущу різницю відносно групи ІР + Е + Аргінін,  $p \leq 0,05$ .

Отримані результати узгоджуються з даними аналізу індексу НОМА-ІР, який був істотно підвищеним у щурів із інсулінорезистентністю порівняно з інтактною групою. Застосування поліфенольного екстракту, особливо у поєднанні з аргініном, сприяло зниженню НОМА-ІР та покращенню чутливості тканин до

інсуліну, що підтверджує інсуліносенсibiliзувальний потенціал досліджуваної модифікації.

Упродовж сьомого тижня експерименту в сироватці крові тварин оцінювали показники ліпідного профілю, зокрема концентрації триацилгліцеролів, загального холестеролу та холестеролу ЛПНЩ та ЛПВЩ, що дало змогу оцінити характер метаболічних змін за умов інсулінорезистентності (табл. 4.10). Отримані результати засвідчили, що тривале споживання фруктозозбагаченої дієти супроводжувалося розвитком виражених дисліпідемічних порушень. Так, у щурів групи ІР було зафіксовано достовірне підвищення концентрації триацилгліцеролів на 38,2 %, загального холестеролу – на 54,1 %, а холестеролу ЛПНЩ – на 50,1 % порівняно з інтактними тваринами. Одночасно спостерігалось зниження рівня холестеролу ЛПВЩ, що свідчить про формування атерогенного характеру змін ліпідного обміну.

Таблиця 4.10

**Зміни показників ліпідного обміну в сироватці крові та печінці щурів під впливом досліджуваних екстрактів**

Показник	ІТ	ІР	ІР + Е	ІР + Е+ Аргінін	ІР + Аргінін	ІР + Арфазе- тин	ІР + Мет- формін
1	2	3	4	5	6	7	8
Сироватка крові							
Тригліцериди, ммоль/л	1,45 ± 0,19	2,35 ± 0,24 *	1,69 ± 0,15 #	1,58 ± 0,18 #	2,15 ± 0,21 &	1,75 ± 0,47	1,63 ± 0,35 #
Загальний холестерол, ммоль/л	3,21 ± 0,19	6,99 ± 0,24 *	4,09 ± 0,37 #	3,57 ± 0,54 #	5,44 ± 0,67 &	4,95 ± 1,63 #	3,38 ± 0,94 #
ХС-ЛПНЩ, мкмоль/мг білка	2,33 ± 0,45	4,67 ± 0,87 *	3,09 ± 0,68 #	2,12 ± 0,45 #	4,02 ± 0,63	3,82 ± 0,74 #	2,57 ± 0,85 #
ХС-ЛПВЩ, мкмоль/мг білка	0,99 ± 0,08	0,54 ± 0,11 *	0,96 ± 0,10 #	1,12 ± 0,13 #	1,06 ± 0,19 #	1,03 ± 0,12 #	0,99 ± 0,08 #
Гомогенат печінки							
Фосфоліпіди, нмоль/мг білка	115,7 ± 11,30	82,9 ± 7,30 *	93,6 ± 8,70	108,5 ± 9,40 #	90,8 ± 8,50	90,4 ± 10,70	105,9 ± 8,40 #
Діацилгліцери- ли, нмоль/мг білка	14,23 ± 1,56	19,36 ± 1,75 *	18,38 ± 2,11	16,54 ± 1,43 #	17,28 ± 1,33	18,41 ± 0,96	15,81 ± 1,96 #

Продовж. табл. 4.10

1	2	3	4	5	6	7	8
Гомогенат печінки							
Холестерол, нмоль/мг білка	10,26 ± 0,96	34,28 ± 4,59 *	24,31 ± 1,94	15,94 ± 2,83 #	29,52 ± 4,59 &	27,05 ± 3,81 &	19,53 ± 1,79 #
Тригліцериди, нмоль/мг білка	57,34 ± 4,42	68,52 ± 5,17 *	62,71 ± 4,25	58,47 ± 3,29 #	67,41 ± 4,83 &	59,91 ± 6,18	55,68 ± 3,93 #
Вільні жирні кислоти, нмоль/мг білка	22,83 ± 1,45	35,33 ± 2,04 *	29,45 ± 1,47	25,33 ± 0,94 #	30,05 ± 1,23 &	27,42 ± 1,11 #	24,97 ± 1,73 #

Примітки:

1. \* – достовірна різниця відносно інтактної групи (ІТ),  $p \leq 0,05$ ;
2. # – достовірна різниця відносно групи ІР,  $p \leq 0,05$ ;
3. & – достовірна різниця відносно групи ІР + Е+Аргінін,  $p \leq 0,05$ .

Застосування поліфенольного екстракту, а особливо його амінокислотної модифікації з аргініном, сприяло істотному зменшенню вираженості зазначених порушень. У групі тварин, які отримували комбінацію Е + Аргінін, рівень загального холестеролу перевищував інтактні значення лише на 10,1 %, а вміст триацилгліцеролів – на 8,2 %. За ефективністю корекції ліпідних показників цей вплив був співставним із дією «Метформіну-Тева», для якого концентрація триацилгліцеролів залишалася вищою за інтактний контроль на 11,4 %, тоді як загальний холестерол був навіть дещо нижчим за вихідні значення. Загалом обидві форми екстракту суттєво послаблювали прояви дисліпідемії.

Аналіз ліпідного складу гомогенатів печінки показав, що у щурів із інсулінорезистентністю відбувалося значне накопичення діацилгліцеролів, триацилгліцеролів, холестеролу та вільних жирних кислот. Паралельно фіксували зменшення вмісту загальних фосфоліпідів у 1,39 раза, тоді як концентрація триацилгліцеролів, вільних жирних кислот і холестеролу зростала у 1,19, 1,54 та 3,34 раза відповідно.

Введення екстракту з листя журавлини великоплодої призводило до часткової нормалізації зазначених показників, а його комбінація з аргініном забезпечувала більш виражений коригувальний ефект. Зокрема, у групі Е + Аргінін вміст тригліцеридів у печінці знижувався майже до рівня інтактних тварин, а

концентрація вільних жирних кислот була істотно меншою, ніж у ІР-групі. Обидва варіанти екстракту сприяли підвищенню рівня фосфоліпідів, причому амінокислотна модифікована форма практично відновлювала їх до фізіологічних значень. Референтні препарати проявляли очікувану, проте менш інтенсивну коригувальну дію.

Узагальнення отриманих даних підтверджує формування експериментальної інсулінорезистентності за умов тривалого вживання фруктозозбагаченої дієти, що супроводжувалося порушеннями вуглеводного та ліпідного обміну як у сироватці крові, так і в печінці.

Застосування поліфенольного екстракту з листя журавлини великоплодої сприяло частковій корекції виявлених метаболічних порушень. Амінокислотна модифікація екстракту з аргініном характеризувалася більш вираженими гіпоглікемічними та інсуліносенсibiliзуючими ефектами, які за сукупністю показників були співставними з дією «Метформіну-Тева» та перевищували ефективність фітопрепарату «Арфазетин», що свідчить про перспективність подальшого вивчення механізмів дії виявленої біологічної активності [154, 161–163].

#### 4.7 Формування гелевих систем з екстрактами листя журавлини великоплодої для напівтвердого екструзійного тривимірного друку зразків

Для обґрунтування можливості використання гелевих систем на основі поліетиленоксиду для SSE-3D-друку було проведено оцінку їх реологічних, технологічних та експлуатаційних характеристик (методика – розд. 2, п. 2.14). Під час оцінки реологічних і технологічних властивостей підготовлених гелевих систем виявлено, що водні гелі поліетиленоксиду (ПЕО) з екстрактом листя журавлини великоплодої характеризуються в'язкою консистенцією коричневого кольору та характерним рослинним запахом. За результатами в'язкісних вимірювань, проведених при швидкості обертання 0,01 об/хв та швидкості зсуву  $0,020 \text{ c}^{-1}$ , середнє значення в'язкості для 12 % гелів ПЕО з екстрактом становило

близько 257 000 сР. На підставі результатів реологічних досліджень та попередніх тестів SSE-3D-друку оптимальна швидкість руху друкуючої головки характеризується рівнем 0,5 мм/с. За використання зазначених параметрів було отримано стандартні решітчасті 3D-структури квадратної форми розміром  $30 \times 30 \times 0,5$  мм, а також одиничні дископодібні зразки (рис. 4.14). Середня маса надрукованих решіток становила  $213,3 \pm 22,9$  мг, тоді як для дископодібних зразків –  $174,8 \pm 10,3$  мг. Площа поверхні решіток варіювала в межах 342–390 мм<sup>2</sup> із середнім значенням  $363,7 \pm 39,6$  мм<sup>2</sup>, а співвідношення практичної та теоретичної площі поверхні в середньому становило 1,12, що свідчить про задовільну відтворюваність геометричних параметрів надрукованих зразків.

Функціональну придатність надрукованих зразків додатково оцінювали шляхом дослідження їх дезінтеграції *in vitro*. Встановлено, що при зануренні в очищену воду за температури  $22 \pm 2$  °С 3D-надруковані зразки повністю руйнувалися протягом 15 хв, що вказує на їхню здатність до швидкого вивільнення активних компонентів.

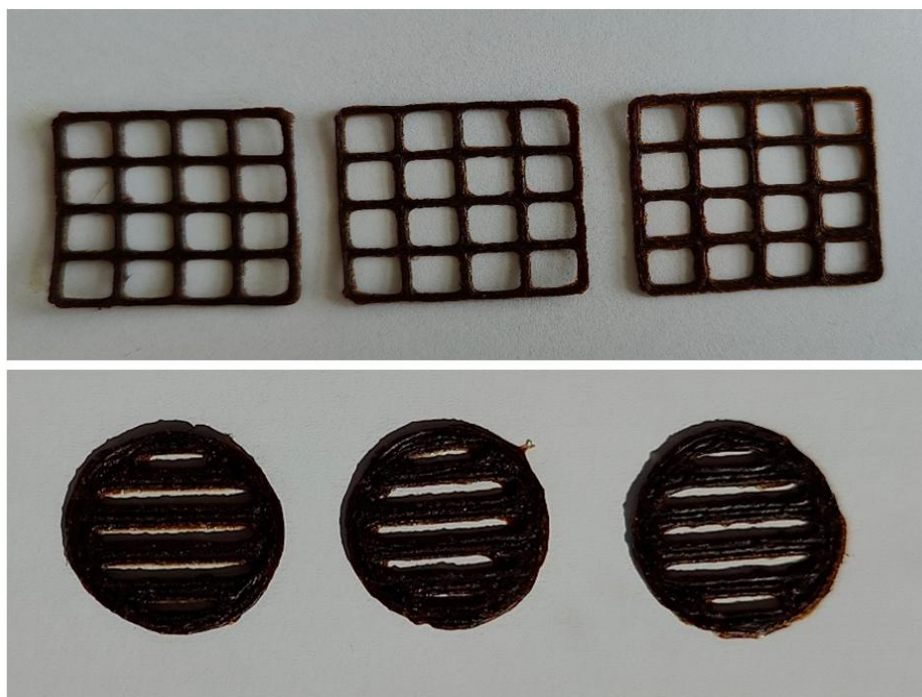


Рис. 4.14 Зовнішній вигляд решіток та дископодібних 3D-надрукованих зразків, отриманих методом SSE з 12 % водного гелю ПЕО з екстрактом листя журавлини великоплодої

Отримані результати підтверджують можливість використання SSE-3D-надрукованих зразків на основі 12 % PEO гелю як перспективних систем негайного вивільнення для перорального застосування екстракту листя журавлини великоплодої, у тому числі у поєднанні з аргініном [154].

#### Висновки до розділу 4

1. Визначено оптимальні умови екстракції біологічно активних речовин з листя журавлини великоплодої. Установлено, що для одержання екстрактів, збагачених фенольними сполуками, 50 % етанол є оптимальним екстрагентом, а найбільш ефективним способом екстракції є метод мацерації за співвідношення сировина : екстрагент 1:10 та трикратної екстракції.

2. Розроблено схеми одержання екстрактів з листя журавлини великоплодої, зокрема сухого екстракту та екстрактів, модифікованих амінокислотами. Новизну технічних рішень підтверджено двома охоронними документами: патент України на винахід № 127117 та патент України на корисну модель № 147975.

3. Проведено фітохімічну ідентифікацію фенольних сполук методом ТШХ. Підтверджено наявність у складі екстрактів сполук, що відповідають стандартним зразкам хлорогенової кислоти, гіперозиду та кверцетину.

4. Установлено мінеральний склад сухого екстракту з листя журавлини великоплодої. Домінантними макроелементами є калій, кальцій та магній, тоді як вміст потенційно токсичних елементів (Pb, Cd, As, Hg, Ni, Co) не перевищує меж кількісного визначення, що свідчить про екологічну безпечність досліджуваної сировини та екстракту.

5. Методом ВЕРХ-ФДМ у складі екстрактів листя журавлини великоплодої ідентифіковано 19 фенольних сполук, серед яких гідроксикоричні кислоти, флавонольні глікозиди, аглікони, флаван-3-оли та проантоціанідини. У немодифікованому екстракті домінують флавонольні глікозиди, зокрема гіперозид, авікулярин та кверцитрин, а серед гідроксикоричних кислот – хлорогенова та неохлорогенова кислоти.

6. Визначено кількісний вміст суми фенольних сполук, флавоноїдів та похідних гідроксикоричних кислот у екстрактах листя журавлини великоплодої із застосуванням спектрофотометричних методів аналізу.

7. Розроблено гелеві системи для SSE-3D-друку зразків з екстрактом листя журавлини великоплодої та екстрактом, модифікованим аргініном, також досліджено реологічні та технологічні характеристики одержаних систем.

8. Визначено антимікробну активність екстрактів з листя журавлини великоплодої щодо *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans* методом дифузії в агар. Екстракти проявляли помірну антимікробну активність, при цьому екстракт, модифікований аргініном, у ряді випадків виявляв вищу активність.

9. Доведено, що сухий екстракт з листя журавлини великоплодої не проявляє ознак гострої токсичності та є безпечним для лабораторних тварин, що обґрунтовує доцільність подальших фармакологічних досліджень.

10. Доведено протизапальну активність екстрактів з листя журавлини великоплодої *in vitro* та *in vivo*. На клітинних моделях шкіри людини екстракт проявляв клітинно-специфічну протизапальну дію зі зниженням секреції прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8. На моделі карагенін-індукованого набряку екстракт з аргініном виявляв більш виражений антиексудативний ефект порівняно з нативним екстрактом.

11. Установлено гепатопротекторну активність екстракту з листя журавлини великоплодої та його амінокислотних модифікацій у моделі CCl<sub>4</sub>-індукованого гепатиту, що проявлялася зниженням коефіцієнта маси печінки, нормалізацією активності трансаміназ та пригніченням процесів ліпопероксидації. Найбільш виражену активність виявляли екстракти, модифіковані аргініном та валіном.

12. Підтверджено гіпоглікемічну та інсуліносенсибілізувальну активність екстракту з листя журавлини великоплодої в моделі інсулінорезистентності, індукованої фруктозозбагаченою дієтою. Комбінація екстракту з аргініном сприяла зниженню рівня глюкози крові, індексу НОМА-IR та нормалізації показників

ліпідного обміну, за ефективністю наближаючись до препарату порівняння «Метформіну-Тева».

*Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:*

1. Визначення параметрів екстракції біологічно активних речовин із журавлини листя / І. К. Власова, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, М. А. Комісаренко, Т. В. Ільїна, А. М. Ковальова. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. № 2 (39). С. 145–152. DOI: 10.14739/2409-2932.2022.2.258524

2. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листя / І. К. Власова, І. В. Боцула, І. В. Кіреєв, О. М. Кошовий. *Вісник фармації*. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13. DOI: 10.24959/nphj.23.106

3. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi, I. Vlasova, V. Jakstas, G. Vilikickyte, R. Hrytsyk, L. Hrytsyk, A. Raal. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010

4. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікарського засобу з листя журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022.

5. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № u 202100821; заявл. 23.06.2021, Бюл. № 25/2021.

6. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica,

J. P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528

7. Власова І. К., Кошовий О. М. Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листя журавлини великоплодої. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Івано-Франківськ, 12–13 трав. 2020 р. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 149.

8. Власова І. К., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Кошовий О. М. Перспектива використання сухого екстракту з листя журавлини великоплодої для корекції інсулінорезистентності. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, м. Харків, 18–19 берез. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 71–72.

9. Власова І. К., Кошовий О. М. Кількісне визначення біологічно активних речовин у настоянках з листя журавлини великоплодої. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матеріали наук.–практ. дист. конф., присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, НФаУ, 2021, С. 76.

10. Власова І. К., Боцула І. В., Рааль А., Кіреєв І. В., Кошовий О. М. Фітохімічне та фармакологічне вивчення сухого екстракту з журавлини великоплодої листя. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вер. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 173–174.

11. Власова І., Комісаренко М., Кошовий О., Кіреєв І. Вивчення хімічного складу та діуретичної активності журавлини листя екстракту сухого. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021* : матеріали Всеукр. наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25–26 лист. 2021 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2021, С. 29–30.

12. Власова І. К., Кошовий О. М. Ідентифікація та кількісне визначення основних біологічно активних речовин в екстрактах з листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) та журавлини болотяної (*Oxycoccus palustris* Pers.). *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 жовт. 2022 р. Тернопіль: ТНМУ, 2022, С. 25–26.

13. Власова І., Кошовий О. Перспектива використання сухих екстрактів зі стебел журавлини. *Запорізький фармацевтичний форум – 2022* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 17–18 лист. 2022 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2022, С. 21.

14. Vlasova I., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A., Koshovyi O. Valine preparation of *Oxycoccus macrocarpus* leaves extract – a promising hepatoprotective agent. Сучасні досягнення фармацевтичної технології : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10–11 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 185.

15. Raal A., Vlasova I., Kravchenko G., Koshovyi O. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus*) leaves extract and its modified arginine preparation for the management of insulin resistance. 71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Dublin, 2–5 July, 2023. *Planta Medica*, 2023. Vol. 89. P. 1385–1386. DOI: 10.1055/s-0043-1774149

16. Laur H., Vlasova I., Koshovyi O., Sandler Topelius N., Heinämäki J., Raal A. Phytochemical and pharmacological study of American cranberry leaves extracts and its dosage forms. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023* : abstract book of the international conference, Tartu, Estonia, 12–13 October, 2023. *Eesti Arst* 2023;102 (Lisa 1): 46.

17. Koshovyi O., Vlasova I., Kravchenko G., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A. The American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaves – a promising source for the creation of medicines for prevention and management of metabolic syndrome and liver diseases. *Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences* : abstract book of the international conference, Hanoi, Vietnam, 8–10 November, 2023. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023. P. 233.

## РОЗДІЛ 5

### СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ ТА ЕКСТРАКТИВ НА ЇХ ОСНОВІ

Результати фармакогностичного аналізу листя журавлини, наведені у розділі 3, а також дані фітохімічного та фармакологічного вивчення екстрактів з листя журавлини великоплодої, представлені у розділі 4, підтвердили доцільність подальшого розроблення підходів до контролю якості та стандартизації досліджуваної рослинної сировини й екстрактів на її основі.

Об'єктами дослідження у даному розділі слугували три серії листя журавлини великоплодої, три серії екстракту з листя журавлини великоплодої та три серії модифікованого екстракту з додаванням аргініну, одержаних за оптимізованими умовами екстракції, описаними у розділі 4 (п. 4.1.3).

Розроблення методик стандартизації здійснювали із застосуванням фармакопейних підходів і методів контролю якості, регламентованих ДФУ 2.0 [93, 97]. Оскільки листя журавлини великоплодої наразі не представлено у чинних фармакопейних монографіях ДФУ, за основу було використано положення монографії «Чорниці листя<sup>N</sup>» [98], адаптовані з урахуванням морфолого-анатомічних і фітохімічних особливостей досліджуваної сировини.

#### 5.1 Розробка методів стандартизації листя журавлини великоплодої

У підрозділі обґрунтовано та наведено основні показники і методи стандартизації листя журавлини великоплодої.

*Макроскопічні ознаки.* Листки прості, розміщені на коротких черешках. Листкова пластинка суцільна, щільної шкірястої консистенції, з вираженою глянцевою поверхнею з адаксіального боку. Забарвлення верхньої поверхні варіює від темно-зеленого до буро-зеленого та коричневого, тоді як абаксіальна поверхня має відтінки від сизувато-зеленого до світло-коричневого. За формою листкова пластинка переважно вузько- або широкоовальна, рідше трапляються округлі чи

яйцеподібні варіанти. Розміри листків становлять 0,3–0,6 см у ширину та 0,8–1,8 см у довжину (рис. 3.2, розд. 3, п. 3.2). Верхівка і основа пластинки заокруглені; край рівний, цілісний, з характерним загином донизу. Тип жилкування перистий: на верхньому боці чітко візуалізуються головна та бічні жилки, тоді як на нижньому боці зазвичай добре виражена головна жилка, а бічні – менш помітні або відсутні.

*Мікроскопічні ознаки.* Черешок у поперечному перерізі овальної форми; адаксіальна сторона дещо сплюснена, абаксіальна – округла; під епідермою наявна кільцеподібна кутова коленхіма (рис. 3.8, 1, розд. 3, п. 3.3). Основна тканина черешка представлена тонкостінною паренхімою з численними друзами кальцію оксалату; провідний пучок один, округлий, зміщений у бік адаксіальної поверхні (рис. 3.8, 1, а–в, розд. 3, п. 3.3).

Листкова пластинка дорзивентрального типу будови з одно–дворядною палісадною та три–чотирирядною губчастою хлоренхімою (рис. 3.8, 2, 3, розд. 3, п. 3.3). Головна жилка однопучкова, не виступає з абаксіальної сторони; навколо бічних жилок формується кристалоносна обкладинка з призматичних і кубічних кристалів кальцію оксалату (рис. 3.8, 5, розд. 3, п. 3.3).

Нижня епідерма представлена прозенхімними клітинами вздовж жилок і паренхімними клітинами між ними; продихи численні, парацитного та аномоцитного типів (рис. 3.8, 4, розд. 3, п. 3.3). Верхня епідерма складається з паренхімних клітин зі звивистими оболонками, продихи відсутні; кутикула слабо виражена, переривчасто-складчаста (рис. 3.8, 6, розд. 3, п. 3.3).

#### *Ідентифікація методом ТШХ*

*Випробовуваний розчин.* До 1,0 г здрібненої до порошкоподібного стану рослинної сировини листя журавлини великоплодої, стандартизованої за фракційним складом (355 мкм) відповідно до вимог загальної статті 2.9.12 ДФУ, додають 10 мл метанолу *P*. Суміш нагрівають у водяній бані зі зворотним холодильником за температури близько 60 °С протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують. Отриманий фільтрат використовують для хроматографічного аналізу.

*Розчин порівняння.* 3,0 мг гіперозиду, 1,0 мг кофейної кислоти, 1,0 мг хлорогенової кислоти та 3,0 мг рутину розчиняють у 10 мл метанолу *P*.

*Пластинка: ТШХ-пластинка з шаром силікагелю Р.*

*Рухома фаза: етилацетат Р – вода Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова безводна Р (72:14:7:7).*

*Об'єм проби, що наноситься: 15 мкл, смугами.*

*Відстань, що має пройти рухома фаза: 15 см від лінії старту.*

*Висушування. За температури від 100 до 105 °С.*

*Виявлення. Пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, після чого обробляють розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, через 30 хв переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.*

*Результати. На хроматограмі розчину порівняння у середній частині проявляється жовтувато-оранжева флуоресцентна зона, що відповідає рутину, вище якої спостерігається жовтувато-оранжева флуоресцентна зона гіперозиду. У верхній частині хроматограми проявляється блакитна флуоресцентна зона, що відповідає кофейній кислоті. На хроматограмі випробовуваного розчину можуть також проявлятися інші флуоресцентні зони.*

*Сторонні домішки (ДФУ 2.1 п. 2.8.2). Не більше 2 % інших сторонніх домішок.*

*Втрата в масі при висушуванні (ДФУ 2.1 п. 2.2.32). Граничне значення показника – не більше 10 %. 1,000 г подрібненого до порошкоподібного стану листя сушать при температурі 105 °С протягом 2 год.*

*Загальна зола. (ДФУ 2.1 п. 2.4.16). Не більше 7 %.*

*Кількісне визначення. Не менше 1 % суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид.*

*Вихідний розчин. Наважку здрібненої до порошкоподібного стану рослинної сировини масою 0,200 г переносять у круглодонну колбу об'ємом 100 мл. До сировини додають 1 мл розчину гексаметилентетрааміну Р з концентрацією 5 г/л, 20 мл ацетону Р та 2 мл хлористоводневої кислоти Р. Отриману суміш піддають кип'ятінню на водяній бані зі зворотним холодильником упродовж 30 хв. Після завершення нагрівання розчин фільтрують крізь ватний тампон у мірну колбу*

місткістю 100 мл. Використаний тампон повертають у колбу з рослинним залишком та здійснюють повторну екстракцію ще двічі по 20 мл *ацетону Р*, кожного разу застосовуючи зворотний холодильник протягом 10 хв. Кожний екстракт після охолодження фільтрують крізь ватний тампон. Об'єднані екстракти додатково фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу та доводять об'єм розчину *ацетоном Р* до 100 мл, промиваючи колбу і фільтр.

Аліквоту одержаного розчину об'ємом 20,0 мл кількісно переносять у ділільну лійку, додають 20 мл *води Р* та здійснюють екстракцію 15 мл *етилацетату Р*. Процедуру екстрагування повторюють тричі, щоразу використовуючи свіжу порцію органічного розчинника. Об'єднані етилацетатні витяги промивають двічі по 50 мл *води Р*, після чого фільтрують через шар *безводного натрію сульфату Р* (10 г) у мірну колбу об'ємом 50 мл та доводять об'єм *етилацетатом Р* до мітки.

*Випробовуваний розчин.* 10,0 мл очищеного етилацетатного екстракту переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 1 мл реактиву *алюмінію хлориду Р* та доводять об'єм розчином 5 % *оцтової кислоти льодяної Р* у *метанолі Р* до мітки.

*Компенсаційний розчин.* Для приготування компенсаційного розчину 10,0 мл вихідного розчину доводять до об'єму 25,0 мл розчином 5 % *оцтової кислоти льодяної Р* у *метанолі Р*.

*Вимірювання.* Оптичну густину випробовуваного розчину визначають через 30 хв після приготування, використовуючи компенсаційний розчин як контроль, за довжини хвилі 425 нм.

Вміст флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, у відсотках, обчислюють за формулою (5.1):

$$X = \frac{A \cdot 1,25}{m}, \quad (5.1)$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 425 нм;

$m$  – маса наважки випробовуваної сировини, г.

У таблиці 5.1 узагальнено результати аналізу зразків листя журавлини великоплодої, отримані із застосуванням розробленого комплексу методів стандартизації.

Таблиця 5.1

**Результати оцінки якості зразків листя журавлини великоплодої  
відповідно до розроблених методів стандартизації**

Показники	Нормативні вимоги	Зразки сировини		
		1	2	3
Зовнішні ознаки – макроскопія	Відповідно до розроблених параметрів	Відп.	Відп.	Відп.
Мікроскопія	Відповідно до розроблених параметрів	Відп.	Відп.	Відп.
Ідентифікація методом ТШХ	Відповідно до розроблених параметрів	Відп.	Відп.	Відп.
Сторонні домішки	Не більше 2 %	0,5 %	1,0 %	0,2 %
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 10,0 %	8,7 %	7,5 %	7,0 %
Загальна зола	Не більше 7 %	4,3 %	3,2 %	3,9 %
Кількісне визначення вмісту суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид	Не менше 1 %	1,22 %	1,36 %	1,25 %

Примітка. Відп. – відповідність встановленим вимогам.

Відповідно до одержаних результатів аналізу всі три серії листя журавлини великоплодої відповідають розробленим методам стандартизації, що підтверджує придатність запропонованого комплексу показників для контролю якості досліджуваної сировини [131].

## 5.2 Розробка методів стандартизації сухого екстракту з листя журавлини великоплодої та модифікованого екстракту з аргініном

Враховуючи рекомендації ДФУ та сучасні підходи до стандартизації, було запропоновано такі показники для стандартизації екстрактів з листя журавлини великоплодої (розд. 4, п. 4.1.4).

*Опис.* Сухі екстракти з листя журавлини великоплодої – аморфні порошки коричневого кольору з червонуватим відтінком, зі слабким специфічним запахом, гігроскопічні.

*Розчинність.* Випробування проводили відповідно до вимог ДФУ [93]. Сухий екстракт легко розчиняється у 50 % етанолі, помірно розчинний у 96 % етанолі, метанолі та воді, дуже мало розчиняється у хлороформі та ефірі. Модифікований екстракт легко розчиняється у 70 % етанолі, помірно розчиняється у 50 і 96 % етанолі, метанолі та воді, мало розчиняється у хлороформі та ефірі.

### *Ідентифікація методами ТШХ*

*Метод А.* Ідентифікація основних флавоноїдів та похідних гідроксикоричних кислоти.

*Випробовуваний розчин.* 50 мг сухого екстракту розчиняють у 10 мл 96 % етанолу або метанолу, фільтрують крізь паперовий фільтр, відпаровують розчинник та розчиняють у 1 мл метанолу; 50 мг модифікованого екстракту розчиняють у 10 мл 70 % етанолу потім фільтрують через паперовий фільтр, відпаровують розчинник та розчиняють у 1 мл метанолу.

*Розчин порівняння.* 1,0 мг гіперозиду, 1,0 мг хлорогенової кислоти розчиняють у 10 мл метанолу Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Рухома фаза: етилацетат Р – вода Р – кислота мурашина безводна Р – кислота оцтова безводна Р (72:14:7:7).*

*Об'єм проби, що наноситься: 10 мкл, смугами.*

*Відстань, що має пройти рухома фаза. 10 см від лінії старту.*

*Висушування. При температурі від 100 °С до 105 °С.*

*Виявлення. Пластинку обприскують розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р (10 г/л у метанолі Р), потім – розчином макрогону 400 Р (50 г/л у метанолі Р), сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.*

*Результати. На хроматограмах випробовуваних розчинів і розчину порівняння спостерігається характерна послідовність флуоресцентних зон (рис. 5.1). На хроматограмах випробовуваних розчинів можуть також виявлятися інші флуоресцентні зони.*

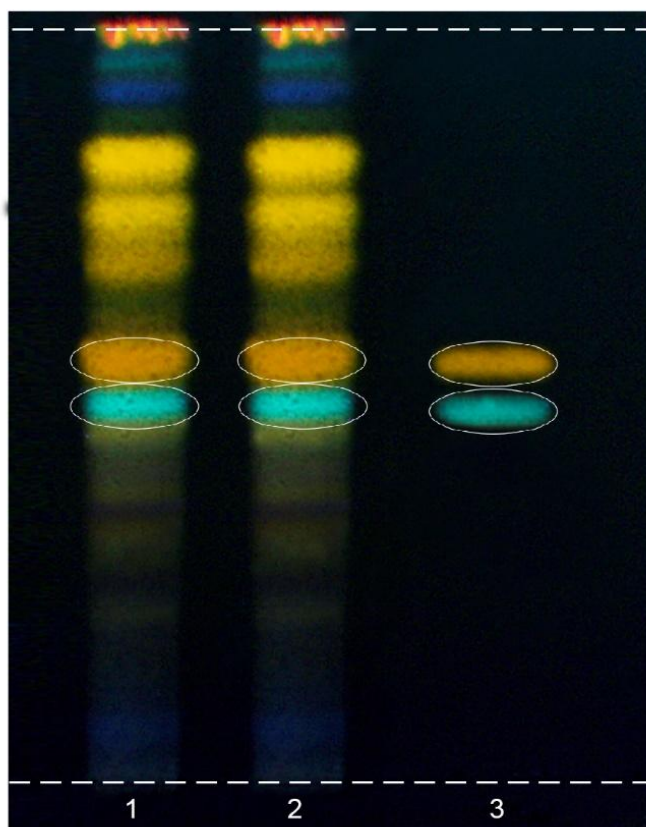


Рис. 5.1 Хроматограма сухого та модифікованого екстрактів з листя журавлини великоплодої: 1 – сухий екстракт; 2 – модифікований екстракт; 3 – розчин порівняння (гіперозид і хлорогенова кислота)

*Метод В.* Ідентифікація аргініну.

*Випробовуваний розчин.* 50 мг екстракту розчиняють у 10 мл 96 % етанолу або метанолу, фільтрують через паперовий фільтр, відпаровують розчинник та розчиняють у 1 мл метанолу.

*Розчин порівняння.* 10 мг ФСЗ аргініну гідрохлориду розчиняють у воді Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл.

*Рухома фаза:* аміаку розчин концентрований Р - 2-пропанол Р (30:70).

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р.

*Об'єм проби, що наноситься:* 10 мкл кожного розчину, смугами.

*Висушування.* При температурі від 100 °С до 105 °С до зникнення запаху аміаку

*Виявлення.* Обприскують нінгідрину розчином Р та нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 15 хв.

На хроматограмі випробовуваного розчину виявляється зона, що відповідає зоні аргініну розчину порівняння.

*Випробування.*

*Важкі метали* (ДФУ 2.1 п. 2.4.8). З метою токсикологічної безпеки їх вміст має бути не більше 100 ppm (0,001 %).

*Мікробіологічна чистота.* (ДФУ 2.1, п. 2.6.12, 2.6.13; методика – розд. 2, п. 2.21). Загальна кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів – не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) у 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій та інших грамнегативних бактерій, *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* у 1 г.

*Втрата в масі при висушуванні* (ДФУ 2.1, п. 2.8.17). Не більше 5,0 %. 0,50 г екстракту поміщають у бюкс і сушать у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 3 год.

*Залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий).* Вміст спирту етилового в екстрактах не повинен перевищувати 1,0 %.

Для аналізу точну наважку екстракту масою 1,0 г розчиняють у 7 мл води Р в мірній колбі місткістю 10 мл, після чого додають 1 мл ацетону Р та 1,2-

*дихлоретану Р* як внутрішні стандарти, після чого об'єм розчину доводять *водою Р* до мітки та ретельно перемішують.

По 1 мкл досліджуваного розчину та розчину стандартного зразка спирту етилового в *етанолі Р* вводять у газовий хроматограф із полуменево-іонізаційним детектором, одержуючи не менше п'яти хроматограм за умов, що відповідають вимогам тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

Кількісний вміст етанолу в екстракті обчислюють із використанням внутрішнього стандарту за співвідношенням площ хроматографічних піків спирту етилового та ацетону. Результати визначення вважають достовірними за умови виконання вимог тесту придатності хроматографічної системи.

#### *Кількісне визначення.*

Вміст *суми флавоноїдів* у екстрактах журавлини великоплодої визначали спектрофотометричним методом у перерахунку на гіперозид за методикою, наведеною у підрозділі 5.1.

Визначення вмісту *суми похідних гідроксикоричної кислоти* проводили спектрофотометричним методом у перерахунку на хлорогенову кислоту.

*Вихідний розчин.* Точну наважку сухого екстракту з листя журавлини великоплодої масою 0,100 г розчиняють при постійному перемішуванні у 5 мл 50 % розчину етилового спирту. Екстрагування повторюють ще двічі з використанням нових порцій розчинника. Одержані витяги об'єднують, фільтрують крізь паперовий фільтр та кількісно переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл. Об'єм розчину доводять до мітки тим самим розчинником і ретельно перемішують.

*Випробовуваний розчин.* 1,0 мл вихідного розчину переносять у мірну колбу місткістю 25,0 мл та доводять об'єм 50 % етанолом до мітки, після чого перемішують.

*Стандартний розчин.* Для приготування стандартного розчину відважують 0,050 г (точна наважка) фармакопейного стандартного зразка кислоти хлорогенової, яку розчиняють у 50 % етанолі в мірній колбі місткістю 100 мл, доводять об'єм до мітки тим самим розчинником та перемішують.

1,0 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємкістю 50,0 мл, доводять об'єм 50 % етанолом до мітки та перемішують.

*Вимірювання.* Оптичну густину випробовуваного та стандартного розчинів вимірюють за довжини хвилі 327 нм, використовуючи 50 % етанол як розчин порівняння.

Вміст суми похідних гідроксикоричної кислоти у перерахунку на кислоту хлорогенову у досліджуваних зразках обчислюють у відсотках за формулою (5.2):

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 25 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 100 \times 1 \times 50 \times (100 - w)}, \quad (5.2)$$

де  $A_1$  – оптична густина дослідного розчину екстракту;

$A_0$  – оптична густина розчину ФСЗ кислоти хлорогенової;

$a_1$  – наважка екстракту, г;

$a_0$  – наважка ФСЗ кислоти хлорогенової, г;

$w$  – втрата в масі при висушуванні, %.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид у сухому екстракті має становити не менше 4 %, тоді як для модифікованого екстракту цей показник не повинен бути нижчим за 2 %. Для суми похідних гідроксикоричної кислоти, визначеної у перерахунку на кислоту хлорогенову, встановлено мінімальний рівень 10 % у сухому екстракті та 3 % у модифікованому екстракті.

Проаналізовано по три серії сухих екстрактів з листя журавлини великоплодої, які відповідали встановленим вимогам розроблених методів стандартизації (табл. 5.2) [164].

**Результати аналізу сухого та модифікованого екстрактів з листя журавлини великоплодої  
за параметрами стандартизації**

Показник якості	Вимоги	Сухий екстракт			Модифікований екстракт		
		Серія			Серія		
		1101	1701	1902	1309	2001	2102
1	2	3	4	5	6	7	8
Опис	Відповідно до встановлених показників стандартизації	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.
Ідентифікація (ТШХ)	Відповідно до встановлених показників стандартизації (метод А)	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.
	Відповідно до встановлених показників стандартизації (метод В)	-	-	-	Відп.	Відп.	Відп.
<b>Випробування</b>							
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 5 %	4,8	4,3	4,1	4,2	4,6	4,3
Залишкові кількості органічних розчинників	Не більше 1,0 %	0,6	0,4	0,7	0,5	0,6	0,8

Продовж. табл. 5.2

1	2	3	4	5	6	7	8
Випробування							
Важкі метали	Не більше 100 ppm	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.
Мікробіологічна чистота	У 1 г препарату – не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) <sup>1</sup> .	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.	Відп.
Кількісне визначення							
Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид	не менше 4 % (для сухого екстракту);	5,17 ±	4,62 ±	5,04 ±	2,60 ±	2,22 ±	2,05 ±
	не менше 2 % (для модифікованого екстракту)	0,06	0,04	0,05	0,05	0,03	0,04
Вміст суми похідних гідроксикоричних кислоти у перерахунку на хлорогенову кислоту	не менше 10 % (для сухого екстракту);	11,47 ±	11,60 ±	11,56 ±	3,07 ±	3,09 ±	3,15 ±
	не менше 3 % (для модифікованого екстракту)	0,07	0,05	0,03	0,04	0,05	0,03

Примітки:

1. Відп. – відповідність встановленим показникам стандартизації;

2. <sup>1</sup> – не допускається наявність ентеробактерій та деяких інших грамнегативних бактерій; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* в 1 г.

## Висновки до розділу 5

1. Обґрунтовано та сформовано комплекс показників стандартизації листя журавлини великоплодої, що включає макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, ідентифікацію методом ТШХ, визначення сторонніх домішок, втрати в масі при висушуванні (не більше 10 %), загальної золи (не більше 7 %), а також кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (не менше 1 %).

2. За результатами проведених досліджень встановлено, що всі три серії листя журавлини великоплодої відповідають вимогам розроблених методів стандартизації, що підтверджує їх придатність для контролю якості досліджуваної рослинної сировини.

3. Запропоновано комплекс методів стандартизації екстрактів з листя журавлини великоплодої (сухого та модифікованого з аргініном), який охоплює показники опису, розчинності, ідентифікації методом ТШХ (з додатковою ідентифікацією аргініну для модифікованого екстракту), випробування на втрату в масі при висушуванні, залишкові кількості етилового спирту (не більше 1 %), вміст важких металів (не більше 100 ppm), мікробіологічну чистоту (не більше 100 мікроорганізмів сумарно, не допускається наявність ентеробактерій та деяких інших грамнегативних бактерій) та кількісні показники біологічно активних сполук. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид має становити не менше 4 % для сухого екстракту та не менше 2 % для модифікованого екстракту; суми похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту – не менше 10 % для сухого екстракту і не менше 3 % для модифікованого екстракту.

4. Результати аналізу експериментальних серій сухого та модифікованого екстрактів засвідчили їх відповідність установленим вимогам розроблених методів стандартизації.

*Результати експериментальних досліджень розділу наведено у публікаціях:*

1. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. Leaves / I. Vlasova, T. Gontova, L. Grytsyk,

G. Zhumashova, G. Sayakova, A. Boshkayeva, M. Shanaida, O. Koshovyi. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352.

2. Vlasova I. K., Koshovyi O. M. Standardization of dry extracts from large cranberry leaves. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 40–45. DOI: 10.24959/ophcj.22.265845

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено вирішення наукової проблеми, що полягає у комплексному фармакогностичному та фармакологічному дослідженні листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Aiton) Pursh), одержанні екстрактів на їх основі, вивченні їх хімічного складу, біологічної активності, безпечності та розробці підходів до стандартизації для створення перспективних фітосубстанцій для фармацевтичного застосування.

1. Проведено фармакогностичне дослідження листя журавлини великоплодої, встановлено комплекс діагностичних макро- та мікроскопічних ознак, придатних для ідентифікації та контролю якості сировини, а також виконано порівняльну оцінку фенольного складу листя журавлини великоплодої і журавлини болотної, яка показала вищий вміст суми фенольних сполук, флавоноїдів і гідроксикоричних кислот у листі журавлини великоплодої.

2. Уперше проведено комплексне фітохімічне дослідження фенольних сполук листя журавлини великоплодої з використанням методів ВЕРХ-ДАД-МС, ТШХ та спектрофотометрії. За результатами ВЕРХ-ДАД-аналізу в листі журавлини великоплодої ідентифіковано складний багатокomпонентний фенольний профіль, хінною та хлорогеновою кислотами, (+)-катехіном, проантоціанідинами типу А та різноманітними глікозидними й ацильованими похідними кверцетину і кемпферолу. Методом ТШХ здійснено якісну ідентифікацію основних фенольних компонентів, тоді як спектрофотометрично визначено кількісний вміст суми фенольних сполук, флавоноїдів і похідних гідроксикоричних кислот.

3. Отримано сухий екстракт із листя журавлини великоплодої та екстракти, модифіковані амінокислотами. Визначено їх якісний склад та кількісний вміст суми фенольних сполук, флавоноїдів та похідних гідроксикоричних кислот із використанням фармакопейних та адаптованих аналітичних методик. Встановлено, що модифікація екстракту амінокислотами впливає на кількісний та якісний склад фенольних сполук, що підтверджено методами хроматографічного аналізу. Новизну розроблених схем одержання сухого екстракту та його модифікації

аргініном підтверджено патентом України на винахід № 127117 та патентом України на корисну модель № 14975.

4. Встановлено, що сухий екстракт з листя журавлини великоплодої при одноразовому внутрішньошлунковому введенні лабораторним тваринам не спричиняє летальності та виражених токсичних проявів, що свідчить про відсутність гострої токсичної дії за умов проведеного експерименту.

5. Доведено антимікробну активність екстракту з листя журавлини великоплодої та його модифікації з аргініном щодо стандартних тест-штамів грампозитивних і грамнегативних бактерій та *Candida albicans*; у частині тест-штамів поєднання з аргініном посилювало ефект.

6. Досліджено протизапальну активність екстрактів з листя журавлини великоплодої: на моделі карагенін-індукованого набряку показано помірний антиексудативний ефект, більш виражений при застосуванні екстракту, модифікованого аргініном, на ранніх етапах запальної реакції. У клітинних моделях шкіри людини *in vitro* екстракт проявляв протизапальну активність, що реалізувалася через зниження секреції прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-8 у цитосумісному концентраційному діапазоні з вираженою клітинною специфічністю.

7. Установлено гепатопротекторну активність екстрактів з листя журавлини великоплодої у моделі  $CCl_4$ -індукованого ураження печінки: введення екстракту в дозі 25 мг/кг, особливо у формі амінокислотних модифікацій з аргініном і валіном, знижувало вираженість біохімічних проявів ушкодження печінки та оксидативного стресу. Встановлено нормалізацію активності АЛАТ і АсАТ, зменшення ліпопероксидації та покращення морфофункціонального стану печінкової тканини, причому ефективність амінокислотних модифікованих форм була зіставною або вищою за препарат порівняння «Силібор».

8. Показано коригувальний вплив екстракту з листя журавлини великоплодої на метаболічні порушення, асоційовані з інсулінорезистентністю: пероральне введення екстракту в дозі 200 мг/кг, особливо у комбінації з аргініном, сприяло зниженню показників глікемічної відповіді на 19–23 %, зменшенню площі під

глікемічною кривою та нормалізації індексу НОМА-IR. За сукупністю показників ефект був співставним з дією «Метформіну-Тева» та перевищував ефективність фітопрепарату «Арфазетин».

9. Розроблено гелеві системи на основі поліетиленоксиду для SSE-3D-друку дозованих форм з екстрактами листя журавлини великоплодої.

10. Розроблено та обґрунтовано методи контролю якості для рослинної сировини (листя журавлини великоплодої) за комплексом показників: макро- та мікроскопія, ТШХ-ідентифікація, сторонні домішки ( $\leq 2\%$ ), втрата в масі при висушуванні ( $\leq 10\%$ ), загальна зола ( $\leq 7\%$ ), кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид ( $\geq 1\%$ ); усі проаналізовані серії сировини відповідали встановленим нормативам.

11. Розроблено методи контролю якості для екстрактів листя журавлини великоплодої (сухого нативного та модифікованого аргініном) за такими показниками: опису, розчинності, ТШХ-ідентифікації (з додатковою ідентифікацією аргініну для модифікованого екстракту), втрати в масі при висушуванні ( $\leq 5\%$ ), залишкового етилового спирту ( $\leq 1\%$ ), важких металів ( $\leq 100$  ppm), мікробіологічної чистоти, а також кількісних нормативів: сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид ( $\geq 4\%$  для сухого екстракту;  $\geq 2\%$  для модифікованого) і сума похідних гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту ( $\geq 10\%$  для сухого;  $\geq 3\%$  для модифікованого); підтверджено відповідність трьох серій екстрактів цим критеріям.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. There and back again; historical perspective and future directions for *Vaccinium* breeding and research studies / Edger et al. *Horticulture Research*. 2022. Vol. 9, № uhac083. DOI: 10.1093/hr/uhac083
2. Morphological and genetic diversity of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L., Ericaceae) clones in Lithuanian reserves / L. Česonienė et al. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2013. Vol. 82, № 3. P. 1–7. DOI: 10.5586/asbp.2013.026
3. United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service: Noncitrus Fruits and Nuts 2024 Summary (May 2025). URL: <https://esmis.nal.usda.gov/?keyword=Fruits+and+Nuts+> (Date of access: 5.12.25).
4. *Vaccinium macrocarpon* (cranberry)-based dietary supplements: variation in mass uniformity, proanthocyanidin dosage and anthocyanin profile demonstrates quality control standard needed / G. Mannino et al. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 992. DOI:10.3390/nu12040992
5. Šedbare R., Pašakinskien I., Janulis V. Changes in the composition of biologically active compounds during the ripening period in fruit of different large cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars grown in the Lithuanian collection. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 202. DOI: 10.3390/plants12010202
6. Development, validation, and application of the UPLC-DAD methodology for the evaluation of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in the fruit of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) / R. Urbstaite et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 467. P. 1–16. DOI: 10.3390/molecules27020467
7. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties / J. Côté et al. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010. Vol. 50. P. 666–679. DOI: 10.1080/10408390903044107
8. *Vaccinium* species—unexplored sources of active constituents for cosmeceuticals / W. Kukula-Koch et al. *Biomolecules*. 2024. Vol. 14, № 1110. DOI: 10.3390/biom14091110

9. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium: Cranberry fruit: *Vaccinium macrocarpon* Aiton / R. Upton et al. Scotts Valley, CA : American Herbal Pharmacopoeia, 2016. 98 p.
10. Степанова С. І. Журавлина. Фармацевтична енциклопедія : офіційний сайт. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1641/zhuravlina> (дата звернення: 6.12.2025).
11. Simões T. R., Marques C. A. *Vaccinium macrocarpon* Aiton (Ericaceae): analyzes of commercial samples with a pharmacognostical approach. *Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia*. 2024. Vol. 16. P. 1–10. DOI: 10.22407/1984-5693.2024.v16.p.e.20241603
12. Khaneja M., Gupta S., Sharma A. Pharmacognostical and preliminary phytochemical investigations on fruit of *Vaccinium macrocarpon* Aiton. *Pharmacognosy Journal*. 2015. Vol. 7, № 6. P. 333–338. DOI: 10.5530/pj.2015.6.3
13. Delahaut K. A., Mahr S. E. R. Cranberries in the United States. *Wisconsin Pesticide Impact Assessment Program*. 1998. 14 p.
14. Dorff E. The changing face of the Canadian fruit and vegetable sector: 1941 to 2011. *Ottawa : Statistics Canada*. 2014. 12 p. URL: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/en/pub/96-325-x/2014001/article/11921-eng.pdf?st=Zc6FI0eV> (Date of access: 6.12.2025).
15. Šedbarē R., Jakštāne G., Janulis V. Phytochemical composition of the fruit of large cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars grown in the collection of the national botanic garden of Latvia. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 771. DOI: 10.3390/plants12040771
16. Initial growth and yield structure of selected cranberry cultivars (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) cultivated on mineral soils in Poland / E. Szwonek et al. *Folia Horticulturae*. 2016. Vol. 28, № 1. P. 77–86. DOI: 10.1515/fhort-2016-0009
17. Kaczmarek E. Growth, flowering and yielding of six American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) cultivars. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2009. Vol. 8, № 4. P. 35–44.

18. Crop profile for cranberry in Canada, 2019. 2021. Pest Management Program. Agriculture and Agri-Food Canada. URL: <https://www.bccranberries.com/wp-content/uploads/2022/02/Crop-Profile-for-Cranberry-in-Canada-2019.pdf> (Date of access: 06.12.2025).
19. Gonçalves E. M., Ganhão R., Pinheiro J. Pre- and postharvest determinants, technological innovations and by-product valorization in berry crops: a comprehensive and critical review. *Horticulturae*. 2026. Vol. 12, № 19. DOI: 10.3390/horticulturae12010019
20. Multiparametric cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) fruit textural trait development for harvest and postharvest evaluation in representative cultivars / H. Lopez-Moreno et al. *Journal of Texture Studies*. 2024. Vol. 55, № e12866. DOI: 10.1111/jtxs.12866
21. United States Department of Agriculture. Food Data Central. Cranberry juice, not fortified, from concentrate, shelf stable: an official website of the United States government. 2021. URL: <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/2003594/nutrients> (Date of access: 10.12.2025).
22. Česonienė L., Daubaras R. Phytochemical composition of the large cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and the small cranberry (*Vaccinium oxycoccos*). *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. 2016. Chapter 8. P. 173–194. DOI: 10.1016/B978-0-12-408117-8.00008-8
23. Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes / P. Viskelis et al. *Journal of Food Science*. 2009. Vol. 74. P. 157–161. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01066.x
24. Research on the mineral composition of cultivated and wild blueberries and cranberries / A. Karlsons et al. *Agronomy Research*. 2018. Vol. 16, № 2. P. 454–463. DOI: 10.15159/AR.18.039
25. Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS / Y. Wang et al. *Plant Science*. 2017. Vol. 262. P. 91–102. DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.06.004

26. The concentration of organic acids in cranberry juice modulates the gut microbiota in mice / V. Renaud et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 11537. DOI: 10.3390/ijms222111537

27. Variability in the qualitative and quantitative composition and content of phenolic compounds in the fruit of introduced American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) / I. Gudžinskaitė et al. *Plants*. 2020. Vol. 9, № 1379. DOI: 10.3390/plants9101379

28. Phenolics of selected cranberry genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait) and their antioxidant efficacy / G. Abeywickrama et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016. Vol. 64. P. 9342–9351. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04291

29. Phytochemical compounds and antioxidant activity in different cultivars of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) / J. Oszmiański et al. *Journal of Food Science*. 2017. Vol. 83. P. 2569–2575. DOI: 10.1111/1750-3841.13924.

30. The effect of different maturity stages on phytochemical composition and antioxidant capacity of cranberry cultivars / J. Oszmiański et al. *European Food Research and Technology*. 2018. Vol. 244. P. 705–719. DOI: 10.1007/s00217-017-2994-z.

31. Brown P. N., Shipley P. R. Determination of anthocyanins in cranberry fruit and cranberry fruit products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2011. Vol. 94, № 2. P. 459–466. DOI: 10.1093/jaoac/94.2.459

32. Kondo M. Phytochemical studies of extracts from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) with anticancer, antifungal and cardioprotective properties. Doctoral dissertation / University of Massachusetts Dartmouth. North Dartmouth, MA, 2006. 250 p.

33. Aborah M., Scarano F., Neto C. Gas chromatography/mass spectrometry chemical profiling of volatile compounds from cranberry plant byproducts as potential antibacterials, antifungals, and antioxidants. *Molecules*. 2025. Vol. 30, № 2047. DOI: 10.3390/molecules30092047

34. Regulation of redox status in neuronal SH-SY5Y cells by blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice, cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.) juice and cyanidin /

G. Cásedas et al. *Food and Chemical Toxicology*. 2018. Vol. 118. P. 572–580.  
DOI: 10.1016/j.fct.2018.05.066

35. Photoprotective effects of cranberry juice and its various fractions against blue light-induced impairment in human retinal pigment epithelial cells / C. H. Chang et al. *Pharmaceutical Biology*. 2017. Vol. 55. P. 571–580.  
DOI: 10.1080/13880209.2016.1263344

36. Pure polyphenols and cranberry juice high in anthocyanins increase antioxidant capacity in animal organs / T. Bariexca et al. *Foods*. 2019. Vol. 8, № 340.  
DOI: 10.3390/foods8080340

37. Anti-aging and redox state regulation effects of A-type proanthocyanidins-rich cranberry concentrate and its comparison with grape seed extract in mice / J. Jiao et al. *Journal of Functional Foods*. 2017. Vol. 30. P. 63–73. DOI: 10.1016/j.jff.2016.12.039

38. Phytochemical analysis and protective effects of *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) in rats (*Rattus norvegicus*) following ethylene oxide-induced oxidative insult / M. Rasool et al. *Bioengineered*. 2021. Vol. 12. P. 4593–4604.  
DOI: 10.1080/21655979.2021.1955528

39. Can cranberry juice protect against rotenone-induced toxicity in rats? / M. Kurpik et al. *Nutrients*. 2021, Vol. 13, № 1050. DOI: 10.3390/nu13041050

40. Tipton D. A., Christian J., Blumer A. Effects of cranberry components on IL-1 $\beta$ -stimulated production of IL-6, IL-8 and VEGF by human TMJ synovial fibroblasts. *Archives of Oral Biology*. 2016. Vol. 68. P. 88–96. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.04.005

41. Effects of cranberry extracts on gene expression in THP-1 cells / D. B. Hannon et al. *Food Science & Nutrition*. Vol. 5. P. 148–159. DOI: 10.1002/fsn3.374

42. Counter-current fractionation-assisted and bioassay-guided separation of active compounds from cranberry and their interaction with  $\alpha$ -glucosidase / H. Xue et al. *LWT- Food Science and Technology*. 2021. Vol. 145, № 111374.  
DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111374

43. Inhibition of NF- $\kappa$ B pathway in LPS-stimulated THP-1 monocytes and COX-2 activity in vitro by berry pomace extracts from five *Vaccinium* species / L. Kunrade, et al. *Journal of Berry Research*. 2020. Vol. 10. P. 381–396. DOI: 10.3233/JBR-190485

44. Anti-inflammatory and macrophage polarization effects of cranberry proanthocyanidins (PACs) for periodontal and peri-implant disease therapy / M. E. Galarraga-Vinueza et al. *Journal of Periodontal Research*. 2020. Vol. 55. P. 821–829. DOI: 10.1111/jre.12773

45. Inhibitory effects of cranberry polyphenol and volatile extracts on nitric oxide production in LPS activated RAW 264.7 macrophages / K. Moore et al. *Food & Function*. 2019. Vol. 10. P. 7091–7102. DOI: 10.1039/C9FO01500K

46. Cranberry proanthocyanidin and its microbial metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, but not 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, partially reverse pro-inflammatory microrna responses in human intestinal epithelial cells / Z. Lofft et al. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2022. Vol. 66, № 2100853. DOI: 10.1002/mnfr.202100853

47. Cranberry juice decreases disease activity in women with rheumatoid arthritis / N. S. B. Thimoteo et al. *Nutrition*. 2019. Vol. 60. P. 112–117. DOI: 10.1016/j.nut.2018.10.010

48. Beneficial effects of fish oil and cranberry juice on disease activity and inflammatory biomarkers in people with rheumatoid arthritis / E. C. S. Fatel et al. *Nutrition*. 2021. Vol. 86, № 111183. DOI: 10.1016/j.nut.2021.111183

49. Dietary cranberry suppressed colonic inflammation and alleviated gut microbiota dysbiosis in dextran sodium sulfate-treated mice / X. Cai et al. *Food & Function*. 2019. Vol. 10. P. 6331–6341. DOI: 10.1039/C9FO01537J

50. Effect of cranberry supplementation on toxins produced by the gut microbiota in chronic kidney disease patients: a pilot randomized placebo-controlled trial / K. T. R. Teixeira et al. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2022. Vol. 47. P. 63–69. DOI: 10.1016/j.clnesp.2021.11.012

51. Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose

cells / K. Kowalska et al. *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, № e0188583. DOI: 10.1371/journal.pone.0188583

52. Cranberry Product Decreases Fat Accumulation in *Caenorhabditis elegans* / Q. Sun et al. *Journal of Medicinal Food*. 2016. Vol. 19, № 4. DOI: 10.1089/jmf.2015.0133

53. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract treatment improves triglyceridemia, liver cholesterol, liver steatosis, oxidative damage and corticosteronemia in rats rendered obese by high fat diet / T. C. Peixoto et al. *Eur J Nutr*. 2018. Vol. 57. P. 1829–1844. DOI: 10.1007/s00394-017-1467-2

54. Effects of unextruded and extruded cranberry pomace on selected metabolic parameters in high-fat diet fed rats / J. Bajerska et al. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2018. Vol. 17. P. 91–100. DOI: 10.17306/J.AFS.2018.0542

55. Cranberry polyphenolic extract exhibits an antiobesity effect on high-fat diet-fed mice through increased thermogenesis / F. Zhou et al. *The Journal of Nutrition*. 2020. Vol. 150. P. 2131–2138. DOI: 10.1093/jn/nxaa163

56. The effect of cranberry consumption on lipid metabolism and inflammation in human apo A-I transgenic mice fed a high-fat and high-cholesterol diet / C. Caceres et al. *British Journal of Nutrition*. 2021. Vol. 126. P. 183–190. DOI: 10.1017/S0007114520004080

57. Co-supplementation of isomalto-oligosaccharides potentiates metabolic health benefits of polyphenol-rich cranberry extract in high fat diet-fed mice via enhanced gut butyrate production / D. P. Singh et al. *European Journal of Nutrition*. 2018. Vol. 57. P. 2897–2911. DOI: 10.1007/s00394-017-1561-5

58. Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6 J mice fed with a high-fat diet / J. Liu et al. *European Journal of Nutrition*. 2021. Vol. 60. P. 2735–2746. DOI: 10.1007/s00394-020-02446-3

59. Antimicrobial and antibiofilm effect of cranberry extract on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an in vitro study / R. Singhal et al. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2020. Vol. 13. P. 11–15. DOI: 10.5005/jp-journals-10005-1707

60. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) fruit juice from Serbia: UHPLC-DAD-MS/MS characterization, antibacterial and antioxidant activities / D. P. Ilić et al. 2021. *LWT-Food Science and Technology*. Vol. 146, № 111399. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111399
61. Transcriptional profiling of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposed to ethanolic extract of organic cranberry pomace / Q. Das et al. *PLoS ONE*. 2019. Vol. 14, № e0219163. DOI: 10.1371/journal.pone.0219163
62. Cranberry-derived proanthocyanidins potentiate  $\beta$ -lactam antibiotics against resistant bacteria / M. Gallique et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2021. Vol. 87, № e00127-21. DOI: 10.1128/AEM.00127-21
63. Cranberry juice and combinations of its organic acids are effective against experimental urinary tract infection / H. D. Jensen et al. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8, № 542. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00542
64. Kim S. A., Kim H. W., Rhee M. S. Cranberry extract with enhanced bactericidal activities against uropathogenic *Escherichia coli* within one minute of treatment. *LWT-Food Science and Technology*. 2019. Vol. 113, № 108318. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108318
65. Cranberry extracts promote growth of *Bacteroidaceae* and decrease abundance of *Enterobacteriaceae* in a human gut simulator model / K. O'Connor et al. *PLoS ONE*. 2019. Vol. 14, № e0224836. DOI: 10.1371/journal.pone.0224836
66. Cranberry extract attenuates hepatic inflammation in high-fat-fed obese mice / S. L. Glisan et al. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016. Vol. 37. P. 60–66. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.009
67. A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss / F. F. Anhê et al. *Molecular Metabolism*. 2017. Vol. 6. P. 1563–1573. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.10.003
68. Hepatoprotective effect of cranberry nutraceutical extract in non-alcoholic fatty liver model in rats: impact on insulin resistance and nrf-2 expression / S. A. Faheem et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2020. Vol. 11, № 218. DOI: 10.3389/fphar.2020.00218

69. Cranberry proanthocyanidins as a therapeutic strategy to curb metabolic syndrome and fatty liver-associated disorders / F. Feldman et al. *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, № 90. DOI: 10.3390/antiox12010090

70. Efficient hepatoprotective activity of cranberry extract against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in Wistar albino rat model: down-regulation of liver enzymes and strong antioxidant activity / F. Hussain et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017. Vol. 10. P. 1054–1058. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.10.008

71. Downregulation of TLR4-NF- $\kappa$ B-p38 MAPK signalling in cholestatic rats treated with cranberry extract / A. M. Fayed et al. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2022. Vol. 25. P. 112–122. DOI: 10.3923/pjbs.2022.112.122

72. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) phytochemicals inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis / L. Shi et al. *Food Bioscience*. 2021. Vol. 42, № 101176. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101176

73. Combined cranberry supplementation and weight loss diet in non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial / R. Hormoznejad et al. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2020. Vol. 71. P. 991–1000. DOI: 10.1080/09637486.2020.1746957

74. Cranberry juice induces nitric oxide-dependent vasodilation *in vitro* and its infusion transiently reduces blood pressure in anesthetized rats / M. M. Maher et al. *Journal of Medicinal Food*. 2009. Vol. 3, № 3. DOI: 10.1089/jmf.2000.3.141

75. Chronic cranberry juice consumption restores cholesterol profiles and improves endothelial function in ovariectomized rats / L. M. Yung et al. *European Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 52. P. 1145–1155. DOI: 10.1007/s00394-012-0425-2

76. Lingonberry, cranberry and blackcurrant juices affect mRNA expressions of inflammatory and atherothrombotic markers of SHR in a long-term treatment / A. S. Kivimäki et al. *Journal of Functional Foods*. 2012. Vol. 4. P. 496–503. DOI: 10.1016/j.jff.2012.02.010

77. Synergistic effect of cranberry extract and losartan against aluminium chloride-induced hepatorenal damage associated cardiomyopathy in rats / S. M. Galal et al.

*Archives of Physiology and Biochemistry* .2019. Vol. 125. P. 357–366.  
DOI: 10.1080/13813455.2018.1465437

78. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating c-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults / J. A. Novotny et al. *The Journal of Nutrition Nutrition and Disease*. 2015. Vol. 145. P. 1185–1193. DOI: 10.3945/jn.114.203190

79. The effects of cranberry on cardiovascular metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis / M. Pourmasoumi et al. *Clinical Nutrition*. 2020. Vol. 39. P. 774–788. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.04.003

80. Rupasinghe H. P. V., Parmar I., Neir S. V. Biotransformation of cranberry proanthocyanidins to probiotic metabolites by *Lactobacillus rhamnosus* enhances their anticancer activity in HepG2 cells *in vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 7, № 4750795. DOI: 10.1155/2019/4750795

81. Cranberry proanthocyanidins modulate reactive oxygen species in Barrett's and esophageal adenocarcinoma cell lines / K. M. Weh et al. *Journal of Berry Research*. 2016. Vol. 6. P. 125–136. DOI: 10.3233/JBR-160122

82. Cranberry A-type proanthocyanidins selectively target acute myeloid leukemia cells / L. M. Bystrom et al. *Blood advances*. 2019. Vol. 3. P. 3261–3265. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018026633

83. Non-extractable polyphenols from cranberries: potential anti-inflammation and anti-colon-cancer agents / Y. Han et al. *Food & Function*. 2019. Vol. 10. P. 7714–7723. DOI: 10.1039/c9fo01536a

84. Dietary feeding of freeze-dried whole cranberry inhibits intestinal tumor development in Apc<sup>min/+</sup> mice / D. Jin et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 58. P. 97787–97800. DOI: 10.18632/oncotarget.22081

85. Chemopreventive effects of whole cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) on colitis-associated colon tumorigenesis / X. Wu et al. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2018. Vol. 62, № e1800942. DOI: 10.1002/mnfr.201800942

86. Bioactive components of polyphenol-rich and non-polyphenol-rich cranberry fruit extracts and their chemopreventive effects on colitis-associated colon cancer /

X. Wu et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020. Vol. 68. P. 6845–6853.  
DOI: 10.1021/acs.jafc.0c02604

87. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 2-е вид. Харків : ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2014. Т. 3. 732 с.

88. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%E6%F3%F0%E0%E2%EB%E8%ED%E0> (дата звернення: 12.12.2025).

89. Safety of cranberry extract powder as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) № 258/97 / D. Turck et al. *EFSA Journal*. 2017. Vol. 15, № 4777. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4777

90. European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 9th ed. Strasbourg, 2016. 1124 p.

91. National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. Dietary Supplement Label Database. URL: <https://dslod.od.nih.gov/search/cranberry/bWFya2V0X3N0YXR1cz1vbl9tYXJrZXQvZW50cnlfZGF0ZT0yMDExLDIwMjUvc29ydD1tYXRjaC9wYWdlX3NpemU9MjAv> (Date of access: 12.12.25).

92. Weber J. T. Traditional uses and beneficial effects of various species of berry-producing plants in eastern Canada. *Canadian Science Publishing*. 2021. Vol. 100. P. 175–182. DOI: 10.1139/cjb-2021-0086

93. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

94. Study of macro- and microelements composition of *Veronica longifolia* L. herb and *Veronica teucrium* L. herb and rhizomes, and extracts obtained from these species / A. Osmachko et al. *Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal*. 2017. № 1. P. 24–28.

95. Бородіна Н. В., Ковальов В. М. Мінеральний склад деяких видів родини Salicaceae. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ, 2018. № 29. С. 180–187.
96. Параметри стандартизації модифікованих екстрактів мучниці звичайної листя / Чайка Н. Б. та ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4 (65). С. 16–23. DOI: 10.24959/ubphj.20.293
97. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
98. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид., 4 допов. Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2020. Т. 2. 600 с.
99. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпта / О. М. Кошовий та ін. *Фармаком*. 2005. № 2/3. С. 151–161.
100. Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves extract and its modified arginine preparation for the management of metabolic syndrome / O. Koshovyi et al. *Nutrients*. 2021. Vol. 13. Article 2870. P. 1–18. DOI: 10.3390/nu13082870
101. Vilckickyte G., Raudone L., Petrikaite V. Phenolic fractions from *Vaccinium vitis-idaea* L. and their antioxidant and anticancer activities assessment. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. P. 1–20. DOI:10.3390/antiox9121261
102. 3D-printability of aqueous poly(ethylene oxide) gels / L. Viidik et al. *European Polymer Journal*. 2019. Vol. 120, № 109206. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109206
103. Pharmaceutical 3D-printing of nanoemulsified eucalypt extracts and their antimicrobial activity / O. Koshovyi et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023. Vol. 187, № 106487. DOI: 10.1016/j.ejps.2023.106487

104. Semi-solid extrusion 3D-printing of eucalypt extract-loaded polyethylene oxide gels intended for pharmaceutical applications / O. Koshovyi et al. *Annals of 3D Printed Medicine*. 2023. Vol. 12. № 100123. DOI: 10.1016/j.stlm.2023.100123
105. Стандартизація приготування мікробних суспензій : інформ. лист про нововведення в системі охорони здоров'я України № 163–2006 / Ю. Л. Волянський, Л. Г. Міроненко, С. В. Калініченко та ін. Київ : Укрмедпатентінформ, 2006. 10 с.
106. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing / EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing, 2020, Version 8.0. 22 p.
107. Orellana E. A., Kasinski A. L. Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation *Bio-protocol*. 2016. Vol. 6, № 21. P. 1–9. DOI: 10.21769/BioProtoc.1984
108. Стефанов О. В., ред. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 527 с.
109. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах : затверджено Першим національним конгресом з біоетики, Київ, 2001. Київ : Вид-во Нац. акад. наук України, 2001.
110. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg : Council of Europe, 1986. P. 1–11.
111. Коваленко В. М. Доклінічні дослідження лікарських засобів в Україні. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2009. № 5. С. 56–61.
112. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity / R. O. Recknagel et al. *Pharmacology & Therapeutics*. 1989. Vol. 43, № 1. P. 139–154. DOI: 10.1016/0163-7258(89)90050-8
113. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. 1957. Vol. 28. P. 56–63. DOI: 10.1093/ajcp/28.1.56
114. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979. Vol. 95. P. 351–358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3

115. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV (у ред. станом на 10 жовт. 2024 р., № 4017-IX). Київ, Верховна Рада України, 2006.

116. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 2010. L. 276. P. 33–79.

117. Evaluation of anti-obesity and lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* leaves powder extract in a hamster model / A. L. Zagayko et al. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2018. Vol. 29. P. 697–703. DOI: 10.1515/jbcpp-2017-0161

118. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity / E. Bonora et al. *Diabetes Care*. 2000. Vol. 23, № 1. P. 57–63. DOI: 10.2337/diacare.23.1.57

119. A simple method for repetitive blood sampling from rats / L. Putcha et al. *Journal of Pharmacological Methods*. 1982. Vol. 8, № 2. P. 145–149. DOI: 10.1016/0160-5402(82)90068-7

120. Tai M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*. 1994. Vol. 17, № 2. P. 152–154.

121. Marsh J. B., Weinstein D. B. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 1966. Vol. 7. P. 574–576.

122. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry et al. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.

123. Fruit physical features, phenolic compounds profile and inhibition activities of cranberry cultivars (*Vaccinium macrocarpon*) compared to wild-grown cranberry (*Vaccinium oxycoccus*) / A. Narwojsz et al. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2019. Vol. 74. P. 300–306. DOI: 10.1007/s11130-019-00737-7

124. Cranberry: chemical composition, antioxidant activity and impact on human health: overview / B. V. Nemzer et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 1503. DOI: 10.3390/molecules27051503
125. Bujor O.C., Tanase C., Popa M.E. Phenolic antioxidants in aerial parts of wild *Vaccinium* species: towards pharmaceutical and biological properties. *Antioxidants (Basel)*. 2019. Vol. 8, № 649. DOI: 10.3390/antiox8120649
126. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results / A. Raal et al. *Folklore*. 2023. Vol. 89, P. 107–142. DOI:10.7592/FEJF2023.89.cranberries
127. Best V. M., Vasanthakumar A., McManus P. S. Anatomy of cranberry stem gall and localization of bacteria in galls. *Phytopathology*. 2004. Vol. 94, № 11. P. 1172–1177. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1172
128. Evaluation of morphological peculiarities, amount of total phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry (*Oxycoccus palustris*) / L. Česonienė et al. *Baltic Forestry*. 2006. Vol. 12, № 1. P. 59–63.
129. Jacquemart A.-L. *Vaccinium Oxycoccus* L. (*Oxycoccus Palustris* Pers.) and *Vaccinium Microcarpum* (Turcz. ex Rupr.) Schmalh. (*Oxycoccus Microcarpum* Turcz. ex Rupr.) *Journal of Ecology*. 1997. Vol. 85, № 3. 381–396.
130. Anatomic atlas of aquatic and wetland plant stems / F. H. Schweingruber et al. *Springer Cham*. 2020. 486 p. DOI: 10.1007/978-3-030-33420-8
131. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. leaves / I. Vlasova et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352
132. *Vaccinium* species (Ericaceae): phytochemistry and biological properties of medicinal plants / G. A. Martău et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 1533. P. 1–30. DOI: 10.3390/molecules28041533
133. Мінеральний склад надземних органів журавлини великоплодої / І. К. Власова та ін. *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 1. С. 46–49. DOI: 10.33617/2522-9680-2020-1-46

134. Власова І. К., Кошовий О. М. Дослідження елементного складу журавлини великоплодої. *Topical issues of new medicines development* : матеріали ХХVII Міжнародної наук.–практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 8–10 квіт. 2020 р. Харків: НФаУ, 2020, С. 30–31.

135. Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC–ESI-MS / I. Tarascou et al. *Food Chemistry*. 2011. Vol. 128. P. 802–810. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.062

136. Characterization by high-performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in a cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity / I. Iswaldi et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. Vol. 58. P. 34–41. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.09.027

137. Nontargeted metabolomic study on variation of phenolics in different cranberry cultivars using UPLC-IM – HRMS / Y. Wang et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018. Vol. 66. P. 12206–12216. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05029

138. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review / J. Azmir et al. *Journal of Food Engineering*. 2013. P. 426–436. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

139. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: panorama, principles, applications and prospects / F. Chemat et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 3007. P. 1–27. DOI:10.3390/molecules24163007

140. Zhang H., Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*. 2016. Vol. 8. P. 33–42. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.02.002

141. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts / S. Sasidharan et al. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2011. Vol. 8, № 1. P. 1–10.

142. Alara O. R., Abdurahman N. H., Ukaegbu C. I. Extraction of phenolic compounds: a review. *Current Research in Food Science*. 2021. Vol. 4. P. 200–214. DOI: 10.1007/s11694-020-00650-2

143. Ignat I., Volf I., Popa V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011. Vol. 126. P. 1821–1835. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026

144. Власова І. К., Кошовий О. М. Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листя журавлини великоплодої. Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження: матеріали наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Івано-Франківськ, 12–13 трав. 2020 р. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 149.

145. Власова І. К., Кошовий О. М. Кількісне визначення біологічно активних речовин у настоянках з листя журавлини великоплодої. Сучасні аспекти створення лікарських засобів : матеріали наук.–практ. дист. конф., присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, НФаУ, 2021, С. 76.

146. Визначення параметрів екстракції біологічно активних речовин із журавлини листя / І. К. Власова та ін. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. № 2(39). С. 145–152. DOI: 10.14739/2409-2932.2022.2.258524

147. Спосіб одержання лікарського засобу з листя журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022.

148. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № u 202100821; заявл. 22.02.2021; 23.06.2021, Бюл. № 25/2021.

149. Chemistry of protein-phenolic interactions toward the microbiota and microbial infections / H. Yılmaz et al. *Frontiers in Nutrition*. Vol. 9. P. 1–16. DOI: 10.3389/fnut.2022.914118

150. Tarasevičien Ž., Velička A., Paulauskien A. Impact of foliar application of amino acids on total phenols, phenolic acids content of different mints varieties under the field condition. *Plants*. 2021. Vol. 10, № 599. P. 1–16. DOI: 10.3390/plants10030599

151. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts / G. Crețu et al. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013. Vol. 18, № 5. P. 8657–8665.

152. Development of a quantitative high performance thin layer chromatographic method for analysis of caffeic acid and quercetin from cranberry extract / G. Crețu et al. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013. Vol. 18, № 3. P. 8271–8278.

153. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi et al. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010

154. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi et al. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528

155. Хомич Н. М., Огоновський Р. З., Патерега І. П. Експериментальне дослідження антиексудативних властивостей препарату «Дексаметазон» та локальної гіпотермії за умов розвитку запалення, викликаного флогогеном карагенін. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2014. № 14 (3). С. 270–273.

156. Власова І. К., Боцула І.В., Рааль А., Кіреєв І. В., Кошовий О. М. Фітохімічне та фармакологічне вивчення сухого екстракту з журавлини великоплодої листя. Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вер. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 173–174.

157. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листя / І. К. Власова та ін. *Вісник фармації*. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13. DOI: 10.24959/nphj.23.106

158. Plaa G. L., Hewitt W. R. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. *Toxicology of the liver*. New York: Raven Press, 1988. P. 407–426.

159. Bode-Böger S. M., Scalera F., Ignarro L. J. The L-arginine paradox: importance of the L-arginine/asymmetric dimethylarginine ratio. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007. Vol. 114. P. 295–306. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.002

160. Vlasova I., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A., Koshovyi O. Valine preparation of *Oxycoccus macrocarpus* leaves extract – a promising hepatoprotective agent. Сучасні досягнення фармацевтичної технології : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10–11 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 185.

161. Raal A., Vlasova I., Kravchenko G., Koshovyi O. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus*) leaves extract and its modified arginine preparation for the management of insulin resistance. 71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Dublin, 2–5 July, 2023. *Planta Medica*, 2023. Vol. 89 P. 1385–1386. DOI: 10.1055/s-0043-1774149

162. Laur H., Vlasova I., Koshovyi O., Sandler Topelius N., Heinämäki J., Raal A. Phytochemical and pharmacological study of American cranberry leaves extracts and its dosage forms. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023* : abstract book of the international conference, Tartu, Estonia, 12–13 October, 2023. *Eesti Arst 2023*;102 (Lisa 1): 46.

163. Koshovyi O., Vlasova I., Kravchenko G., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A. The American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaves – a promising source for the creation of medicines for prevention and management of metabolic syndrome and liver diseases. *Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences* : abstract book of the international conference, Hanoi, Vietnam, 8–10 November, 2023. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023. P. 233.

164. Vlasova I. K., Koshovyi O. M. Standardization of dry extracts from large cranberry leaves. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 40–45. DOI: 10.24959/ophcj.22.265845

**ДОДАТКИ**

## Додаток А

## Список публікацій здобувача

1. Мінеральний склад надземних органів журавлини великоплодої / І. К. Власова, О. М. Кошовий, М. А. Комісаренко, А. М. Ковальова, Т. В. Ільїна. *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 1. С. 46–49. DOI: 10.33617/2522-9680-2020-1-46 URL: <https://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/22595> (Scopus, квартал Q4) (Особистий внесок здобувача – проведено інформаційний пошук, пробопідготовку, участь у аналізі та узагальненні результатів дослідження та підготовці статті до друку; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формування висновків; Комісаренко М. А. – допомога в організації експериментальних досліджень; Ковальова А. М. – аналіз результатів; Ільїна Т. В. – формулювання деяких положень, допомога в організації написання висновків).

2. Визначення параметрів екстракції біологічно активних речовин із журавлини листя / І. К. Власова, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, М. А. Комісаренко, Т. В. Ільїна, А. М. Ковальова. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2022. № 2 (39). С. 145–152. DOI: 10.14739/2409-2932.2022.2.258524 URL: <https://pharmed.zsmu.edu.ua/article/download/258524/258742> (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, пробопідготовку, брала участь у обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – допомога в організації експериментальних досліджень, оформлення результатів; Кухтенко О. С. – формулювання цілей та задач дослідження, формування висновків; Комісаренко М. А. – аналіз результатів дослідження; Ільїна Т. В. – аналіз результатів дослідження; Ковальова А. М. – огляд літературних джерел).

3. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. leaves / I. Vlasova, T. Gontova, L. Grytsyk, G. Zhumashova, G. Sayakova, A. Boshkayeva, M. Shanaida, O. Koshovi. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352 URL: [https://journals.uran.ua/sr\\_pharm/article/view/260352](https://journals.uran.ua/sr_pharm/article/view/260352) (Scopus, квартал Q3) (Особистий внесок – виконана частина експериментального

дослідження, підготовлено статтю до друку; Гонтова Т. М. – виконана частина експериментального дослідження, формування висновків; Грицик Л. М. – оформлення статті; Жумашова Г. Т. – проведено обробку матеріалу; Саякова Г. М. – аналіз літературних джерел; Бошкаєва А. К. – аналіз літературних джерел; Шанайда М. І. – формування висновків; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, аналіз результатів дослідження).

4. Vlasova I. K., Koshovyi O. M. Standardization of dry extracts from large cranberry leaves. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2022. Vol. 20, № 3. P. 40– 45. DOI: 10.24959/ophcj.22.265845 URL: <https://ophcj.nuph.edu.ua/article/download/265845/262793/615611> (Особистий внесок здобувача – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків).

5. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листя / І. К. Власова, І. В. Боцула, І. В. Кіреєв, О. М. Кошовий. *Вісник фармації*. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13. DOI: 10.24959/nphj.23.106 URL: <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/30227> (Особистий внесок – виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку; Боцула І. В. – виконана частина експериментального дослідження; Кіреєв І. В. – аналіз результатів дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків).

6. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi, I. Vlasova, V. Jakstas, G. Vilikickyte, R. Hrytsyk, L. Hrytsyk, A. Raal. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010 URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/10/2010> (Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q1) (Особистий внесок – виконана частина експериментального дослідження, підготовлено статтю до друку; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Jakstas V. – аналіз результатів дослідження; Vilikickyte G. – виконана частина експериментального дослідження;

Грицик Л. М. – формування висновків, підготовлення статті до друку; Грицик Р. А. – виконана частина експериментального дослідження; Raal A. – формування висновків, аналіз літературних джерел).

7. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results / A. Raal, M. Kõiva, A. Kuperjanov, K. Vilbaste, I. Vlasova, O. Koshovyi. *Folklore*. 2023. Vol. 89, P. 107—142. DOI:10.7592/FEJF2023.89.cranberries URL: [https://www.researchgate.net/publication/372821575\\_Multi-Use\\_of\\_Cranberries\\_Vaccinium\\_Spp\\_Heritage\\_and\\_Pharmaceutical\\_Results](https://www.researchgate.net/publication/372821575_Multi-Use_of_Cranberries_Vaccinium_Spp_Heritage_and_Pharmaceutical_Results) (**Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q3**) (Особистий внесок здобувача – проведено аналіз літературних даних, брала участь у обговоренні та оформленні статті; Raal A. – оформлення статті та аналіз літературних джерел; Kõiva M. – формулювання розділів, допомога в написанні статті; Kuperjanov A. – оформлення статті та аналіз літературних джерел; Vilbaste K. – пошук та аналіз літературних джерел; Кошовий О. М. – оформлення статті та аналіз літературних джерел).

8. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica, J. P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528 URL: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/11/2528> (**Scopus; Web of Science Core Collection, квартал Q1**) (Особистий внесок – проведено пошук літературних джерел, пробопідготовку, брала участь у аналізі, обговоренні, узагальненні результатів дослідження та оформленні статті; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, написання висновків; Laur H. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в написанні висновків; Kravchenko G. B. – виконана частина експериментального дослідження, обговорення результатів; Красильнікова О. А. – виконана частина експериментального дослідження; Granica S. – аналіз результатів дослідження; Piwowarski J. P. – участь у обговоренні результатів; Heinämäki J. – обговорення результатів, аналіз літературних джерел; Raal A. – участь у обговоренні результатів).

9. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікарського засобу з листя журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022. (Особистий внесок – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).

10. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № и 202100821; заявл. 23.06.2021, Бюл. № 25/2021. (Особистий внесок – брала участь у здійсненні патентного пошуку, експериментальних дослідженнях та оформленні патенту).

11. Власова І. К., Кошовий О. М. Дослідження елементного складу журавлини великоплодої. *Topical issues of new medicines development* : матеріали ХХVІІ Міжнародної наук.–практ. конф. молодих учених та студентів, м. Харків, 8–10 квіт. 2020 р. Харків: НФаУ, 2020, С. 30–31.

12. Власова І. К., Кошовий О. М. Вибір оптимального екстрагенту для екстракції БАР з листя журавлини великоплодої. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Івано-Франківськ, 12–13 трав. 2020 р. Івано-Франківськ: ІФНМУ, 2020. С. 149.

13. Власова І. К., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Кошовий О. М. Перспектива використання сухого екстракту з листя журавлини великоплодої для корекції інсулінорезистентності. *Topical issues of new medicines development* : матеріали ХХVІІІ Міжнар. наук.-практ. конф. молодих учених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка, м. Харків, 18–19 берез. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 71–72.

14. Власова І. К., Кошовий О. М. Кількісне визначення біологічно активних речовин у настоянках з листя журавлини великоплодої. *Сучасні аспекти створення*

*лікарських засобів* : матеріали наук.–практ. дист. конф., присвяченої 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ, м. Харків, 16 квіт. 2021 р. Харків, НФаУ, 2021, С. 76.

15. Власова І. К., Боцула І.В., Рааль А., Кіреєв І. В., Кошовий О. М. Фітохімічне та фармакологічне вивчення сухого екстракту з журавлини великоплодої листя. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 100-річчю Національного фармацевтичного університету, м. Харків, 10 вер. 2021 р. Харків : НФаУ, 2021, С. 173–174.

16. Власова І., Комісаренко М., Кошовий О., Кіреєв І. Вивчення хімічного складу та діуретичної активності журавлини листя екстракту сухого. *Запорізький фармацевтичний форум – 2021* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 25–26 лист. 2021 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2021, С. 29–30.

17. Власова І. К., Кошовий О. М. Ідентифікація та кількісне визначення основних біологічно активних речовин в екстрактах з листя журавлини великоплодої (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) та журавлини болотяної (*Oxycoccus palustris* Pers.). *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 жовт. 2022 р. Тернопіль: ТНМУ, 2022, С. 25–26.

18. Власова І., Кошовий О. Перспектива використання сухих екстрактів зі стебел журавлини. *Запорізький фармацевтичний форум – 2022* : матеріали Всеукр. наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 17–18 лист. 2022 р. Запоріжжя: ЗДМУ, 2022, С. 21.

19. Vlasova I., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A., Koshovyi O. Valine preparation of *Oxycoccus macrocarpus* leaves extract – a promising hepatoprotective agent. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : матеріали X міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 60-річчю з дня народж. д-ра фармацевт. наук, проф. Гладуха Євгенія Володимировича, м. Харків, 10–11 трав. 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. С. 185.

20. Raal A., Vlasova I., Kravchenko G., Koshovyi O. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus*) leaves extract and its modified arginine preparation for the

management of insulin resistance. 71st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Dublin, 2–5 July, 2023. *Planta Medica*, 2023. Vol. 89 P. 1385–1386. DOI: 10.1055/s-0043-1774149

21. Laur H., Vlasova I., Koshovyi O., Sandler Topelius N., Heinämäki J., Raal A. Phytochemical and pharmacological study of American cranberry leaves extracts and its dosage forms. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023* : abstract book of the international conference, Tartu, Estonia, 12–13 October, 2023. *Eesti Arst* 2023;102 (Lisa 1): 46.

22. Koshovyi O., Vlasova I., Kravchenko G., Hrytsyk R., Grytsyk L., Raal A. The American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) leaves – a promising source for the creation of medicines for prevention and management of metabolic syndrome and liver diseases. *Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences* : abstract book of the international conference, Hanoi, Vietnam, 8–10 November, 2023. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2023. P. 233.

Продовж. дод. А

### Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. XXVII Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «*Topical issues of new medicines development*» (Харків, 8–10 квітня 2020 р., форма участі – публікація тез).

2. Науково-практична конференція з міжнародною участю «*Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження*» (Івано-Франківськ, 12–13 травня 2020 р., форма участі – публікація тез).

3. XXVIII Міжнародна науково-практична конференція молодих учених та студентів «*Topical issues of new medicines development*», присвячена 150-річчю з дня народження М. О. Валяшка (Харків, 18–19 березня 2021 р., форма участі – публікація тез).

4. Науково-практична дистанційна конференція «*Сучасні аспекти створення лікарських засобів*», присвячена 100-річчю кафедри аналітичної хімії НФаУ (Харків, 16 квітня 2021 р., форма участі – публікація тез).

5. Науково-практична конференція з міжнародною участю «*Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*», присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету (Харків, 10 вересня 2021 р., форма участі – публікація тез).

6. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Запорізький фармацевтичний форум – 2021*» (Запоріжжя, 25–26 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез).

7. VI Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Хімія природних сполук*» (Тернопіль, 27–28 жовтня 2022 р., форма участі – публікація тез).

8. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький фармацевтичний форум – 2022» (Запоріжжя, 17–18 листопада 2022 р., форма участі – публікація тез).

9. X Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології», присвячена 60-річчю з дня народження проф. Є. В. Гладуха (Харків, 10–11 травня 2023 р., форма участі – публікація тез).

10. Міжнародний конгрес та щорічна зустріч Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) (Дублін, Ірландія, 2–5 липня 2023 р., форма участі – публікація тез).

11. Міжнародна наукова конференція «*Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023*» (Тарту, Естонія, 12–13 жовтня 2023 р., форма участі – публікація тез).

12. Міжнародна наукова конференція «*Collaboration for Breakthroughs in Pharmaceutical Sciences*» (Ханой, В'єтнам, 8–10 листопада 2023 р., форма участі – публікація тез).

Додаток Б



Продовж. дод. Б



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147975** (13) **U**  
 (51) МПК  
**A61K 36/45** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
 ВЛАСНОСТІ  
 ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
 "УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
 ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2021 00821**  
 (22) Дата подання заявки: **22.02.2021**  
 (24) Дата, з якої є чинними  
 права інтелектуальної  
 власності: **24.06.2021**  
 (46) Публікація відомостей  
 про державну  
 реєстрацію: **23.06.2021, Бюл.№ 25**

(72) Винахідник(и):  
**Кошовий Олег Миколайович (UA),  
 Власова Інна Костянтинівна (UA),  
 Брюханова Тетяна Олександрівна (UA),  
 Красільнікова Оксана Анатоліївна (UA),  
 Кравченко Ганна Борисівна (UA),  
 Загайко Андрій Леонідович (UA),  
 Комісаренко Микола Андрійович (UA)**  
 (73) Володілець (володільці):  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
 УНІВЕРСИТЕТ,  
 вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ З ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛОДОЇ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНИХ СТАНІВ****(57) Реферат:**

Спосіб одержання засобу для корекції інсулінорезистентних станів, що включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, згідно з корисною моделлю як рослинну сировину використовують листя журавлини великоплідної, екстракцію проводять трикратно у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10, очищення проводять шляхом відстоювання, відокремлення надосадової рідини та фільтруванням, додаванням аргініну у трикратній еквімолярній кількості відносно загальної суми фенольних сполук.

**UA 147975 U**

## Додаток В



Продовж. дод. В



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127117** (13) **C2**

(51) МПК

**A61K 36/45** (2006.01)**A61K 127/00** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2021 00825**  
 (22) Дата подання заявки: **22.02.2021**  
 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **04.05.2023**  
 (41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2022, Бюл.№ 34**  
 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **03.05.2023, Бюл.№ 18**

- (72) Винахідник(и):  
**Кошовий Олег Миколайович (UA),  
 Власова Інна Костянтинівна (UA),  
 Брюханова Тетяна Олександрівна (UA),  
 Красільнікова Оксана Анатоліївна (UA),  
 Кравченко Ганна Борисівна (UA),  
 Загайко Андрій Леонідович (UA),  
 Комісаренко Микола Андрійович (UA)**
- (73) Володілець (володільці):  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
 УНІВЕРСИТЕТ,  
 вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
 UA 103359 U, 10.12.2015  
 UA 142210 U, 25.05.2020  
 UA 111134 C2, 25.03.2016  
 UA 145170 U, 25.11.2020  
 WO 2011088420 A1, 21.07.2011  
 Ferlemi Anastasia-Varvara, Fotini N. Lamari.  
 Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. // Antioxidants.- 2016.- 5, 17.- P. 1-20  
 Baskaran G. HMG-CoA reductase inhibitory activity and phytochemical investigation of Basella alba leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. / Baskaran G., Salvamani S., Ahmad S. A., Shaharuddin N. A., Pattiram P. D., Shukor M. Y. // Drug design, development and therapy.- 2015.- 9.- P. 509-517  
 UA 89735 U, 25.04.2014

UA 127117 C2

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ З ЛИСТЯ ЖУРАВЛИНИ ВЕЛИКОПЛІДОЇ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ СИНДРОМУ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ****(57) Реферат:**

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способу одержання лікарського засобу для корекції синдрому інсулінорезистентності, що включає екстракцію рослинної сировини 50 % розчином спирту етилового, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, при якому як рослинну сировину використовують листя журавлини великоплідної, екстракцію проводять трикратно у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10, очищення проводять шляхом відстоювання, відокремлення надосадової рідини та фільтруванням, додаванням аргініну у трикратній еквімолярній кількості відносно загальної суми фенольних сполук.

## Додаток Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти  
з наукової роботи  
Тернопільського національного  
медичного університету  
імені І. Я. Горбачевського



проф. Іван КЛІЩ

«16» січня 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Результати досліджень щодо розробки нових лікарських засобів з журавлини листа для корекції метаболічного синдрому.
- 2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, асп. Власова І.К., проф. Кухтенко О.С., проф. Кошовий О. М.
- 3. Джерело інформації:**
  1. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica, J.P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. (Scopus; Web of Science Core Collection) DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528
  2. Кошовий О.М., Власова І.К., Брюханова Т.О., Красільнікова О.А., Кравченко Г.Б., Загайко А.Л., Комісаренко М.А. Спосіб одержання лікарського засобу з листа журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022.
  3. Кошовий О.М., Власова І.К., Брюханова Т.О., Красільнікова О.А., Кравченко Г.Б., Загайко А.Л., Комісаренко М.А. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листа журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № u 202100821; заявл. 23.06.2021, Бюл. № 25/2021.
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.
- 5. Форма впровадження:** наукова робота викладачів кафедри, навчальний процес (лекційний курс).
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань вивчення хімічного складу журавлини листа, а також нових біологічно активних субстанцій на його основі для корекції метаболічного синдрому.
- 7. Строки впровадження:** 2025-2026 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою  
Тернопільського національного медичного університету  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України  
д.фарм.н., доц.

Марія ШАНАЙДА

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи  
Запорізького державного медико-  
фармацевтичного університету

проф. Вадим ВІЗІР

04 2026 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Найменування пропозиції для впровадження:** методи одержання екстрактів з листя журавлини великоплодої, дослідження їх хімічного складу та виявлення гепатопротекторної, протизапальної, гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, асп. Власова І. К., проф. Кухтенко О.С., проф. Кошовий О. М.,

**3. Джерело інформації:**

1. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листя / І. К. Власова, І. В. Боцула, І. В. Кіреєв, О. М. Кошовий. Вісник фармації. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13. DOI: 10.24959/nphj.23.106
2. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi, I. Vlasova, V. Jakstas, G. Vilikickyte, R. Hrytsyk, L. Hrytsyk, A. Raal. Plants. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010.
3. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results / A. Raal, M. Kõiva, A. Kuperjanov, K. Vilbaste, I. Vlasova, O. Koshovyi. Folklore. 2023. Vol. 89, P. 107—142. DOI:10.7592/FEJF2023.89.cranberries.
4. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica, J. P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, № 2528. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528

**4. Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медико-фармацевтичного університету

**5. Форма впровадження:** наукова робота викладачів кафедри, навчальний процес (лекційний курс).

**6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань викладачів та студентів з питань одержання екстрактів з листя журавлини, дослідження їх хімічного складу, гепатопротекторної, протизапальної, гіпоглікемічної та гіполіпідемічної активності.

**7. Строки впровадження:** 2025-2026 навчальний рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії,

фармакології та ботаніки

Запорізького державного медико-фармацевтичного  
університету, д.біол.н.

проф. Сергій ТРЖЕЦИНСЬКИЙ

Продовж. дод. Г

Проректор з наукової роботи Івано-Франківського національного медичного університету  
д.мед.н., професор Власова І.К.  
« 16 » \_\_\_\_\_ 2025 р.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Підходи до створення сухих модифікованих екстрактів з листя журавлини великоплодої. Результати вивчення їх хімічного складу та фармакологічної активності.
- 2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, асп. Власова І.К., проф. Кухтенко О.С., проф. Кошовий О. М.
- 3. Джерело інформації:**
  1. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікарського засобу з листя журавлини великоплодної для корекції синдрому інсулінорезистентності: пат. 127117 України. № а 202100825; заявл. 22.02.2021; опубл. 25.08.2022, Бюл. № 34/2022.
  2. Кошовий О. М., Власова І. К., Брюханова Т. О., Красільнікова О. А., Кравченко Г. Б., Загайко А. Л., Комісаренко М. А. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу з листя журавлини великоплодної для корекції інсулінорезистентних станів: пат. 147975 України. № и 202100821; заявл. 23.06.2021, Бюл. № 25/2021.
  3. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts / O. Koshovyi, I. Vlasova, H. Laur, G. Kravchenko, O. Krasilnikova, S. Granica, J. P. Piwowarski, J. Heinämäki, A. Raal. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528. (Scopus; Web of Science Core Collection) DOI: 10.3390/pharmaceutics15112528
  4. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study / O. Koshovyi, I. Vlasova, V. Jakstas, G. Vilikickyte, R. Hrytsyk, L. Hrytsyk, A. Raal. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. (Scopus; Web of Science Core Collection) DOI: 10.3390/plants12102010
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету.
- 5. Форма впровадження:** науково-дослідна робота, навчальний процес у лекційному курсі.
- 6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань викладачів та студентів з питань одержання модифікованих екстрактів, хімічного складу та фармакологічної активності екстрактів з листя журавлини.
- 7. Строки впровадження:** 2025-2026 навчальний рік.

Зав. кафедри фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії  
Івано-Франківського національного  
медичного університету,  
д.фарм.н,

проф. А. Р. Гришук

Продовж. дод. Г



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Результати досліджень хімічного складу та фармакологічної активності екстрактів листа журавлини.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Власова І.К., професор Кухтенко О.С., професор Кошовий О.М.

3. **Джерела інформації:**

1. Власова І.К., Боцула І.В., Кіресв І.В., Кошовий О.М. Дослідження хімічного складу та протизапальної активності екстрактів сухих з журавлини великоплодої листа. *Вісник фармації*. 2023. Вип. 105, № 1. С. 8–13. DOI: 10.24959/nphj.23.106 <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/30227>

2. Koshovyi O., Vlasova I., Jakstas V., Vilikickyte G., Hrytsyk R., Hrytsyk L., Raal A. American cranberry (*Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh) leaves extract and its amino-acids preparation: the phytochemical and pharmacological study. *Plants*. 2023. Vol. 12, № 2010. DOI: 10.3390/plants12102010

3. Raal A., Kõiva M., Kuperjanov A., Vilbaste K., Vlasova I., Koshovyi O. Multi-use of cranberries (*Vaccinium* spp.): Heritage and pharmaceutical results. *Folklore*. 2023. Vol. 89, P. 107-142.

4. Koshovyi O., Vlasova I., Laur H., Kravchenko G., Krasilnikova O., Granica S., Piwowarski J.P., Heinämäki J., Raal A. Chemical composition and insulin-resistance activity of arginine-loaded American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae) leaf extracts. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2528.

4. **Впроваджено:** В навчальний і науковий процес кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії з «25» грудня 2025 р.

5. **Результат впровадження:** поглиблення знань викладачів та студентів з питань хімічного складу екстрактів з листа журавлини та їх фармакологічної активності.

6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету

Протокол № 7 від «25» грудня 2025 р.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії,  
доктор медичних наук, професор

Я. В. Рожковський

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
ПВНЗ «Київський медичний університет»

Ім'я: Юрій П'ЯТНИЦЬКИЙ

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Найменування пропозиції для впровадження:** Підходи до стандартизації екстрактів листя журавлини.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, асп. Власова І.К., проф. Кухтенко О.С., проф. Кошовий О. М.

**3. Джерело інформації:**

1. Визначення параметрів екстракції біологічно активних речовин із журавлини листя / Власова І. К., О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, М. А. Комісаренко, Т. В. Льїна, А. М. Ковальова. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. № 2(39). С. 145–152.
2. 3. Determination of standardization parameters of *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pursh and *Oxycoccus palustris* Pers. leaves / I. Vlasova, T. Gontova, L. Grytsyk, G. Zhumashova, G. Sayakova, A. Boshkayeva, M. Shanaida, O. Koshovyi. ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2022. Vol. 3, № 37. P. 48–57. (Scopus) DOI: 10.15587/2519-4852.2022.260352
3. Vlasova I. K., Koshovyi O. M. Standardization of dry extracts from large cranberry leaves. Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. 2022. Vol. 20, № 3. P. 40–45. DOI: 10.24959/ophej.22.265845

**4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної і біологічної хімії, фармакогнозії ПВНЗ «Київський медичний університет» (протокол № 5 від 18.12.2025 ).

**5. Форма впровадження:** науково-дослідна робота, навчальний процес у лекційному курсі.

**6. Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів з питань хімічного складу та стандартизації екстрактів з листя журавлини.

**7. Строки впровадження:** 2025-2026 навчальний рік.

Завідувач кафедри  
фармацевтичної і біологічної хімії,  
фармакогнозії  
ПВНЗ «Київський медичний університет»,  
д.фарм.н, проф.



Олена КОНОВАЛОВА