

АНОТАЦІЯ

Хронот О. С. Використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*. – Кваліфікаційна праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 - Фармація, промислова фармація. – Національний університет «Львівська політехніка», Львів, 2021.

Дисертаційну роботу присвячено одержанню калюсних біомас з введених в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., їх фітохімічному дослідженню та встановленню їх фармакологічної активності.

Аналіз наукових публікацій дозволив виявити, що рослини родини *Ranunculaceae*, зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) містять значну кількість біологічно активних речовин, мають чисельні фармакологічні активності, здавна використовуються у народній медицині і є перспективною сировиною для виробництва фітопрепаратів. Однак, це рідкісні види лікарських рослин, запаси рослинної сировини є обмежені, і на українському ринку лікарських засобів (ЛЗ) на основі сировини *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. відсутні. Альтернативним джерелом одержання біомаси та продукованих цими рослинами БАР є культивування в умовах *in vitro*. Використання методу клітинних культур дає можливість регулювати процес накопичення калюсної біомаси, оптимізувати умови вирощування з метою збільшення кількості цільового продукту, а також стандартизувати склад як лікарської сировини, так і готових фітопрепаратів.

Вперше для рослин родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. розроблено та науково обґрунтовано біотехнологічні підходи до одержання БАР в системі *in vitro*.

Підібрано стерилізуючі агенти для максимального одержання життєздатних експлантів. Вивчено вплив регуляторів росту на ріст калюсної біомаси, встановлено умови культивування для кожної рослини з найвищим виходом калюсної біомаси, підібрано схеми стратифікації та стерилізації, регулятори росту та їх концентрацію, отримано КБ з корневих, листових, стеблових, черешкових експлантів. При дослідженні культивування в *in vitro Anemone nemorosa* L. встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС) з 1,0 мг/л ІОК, 0,2 мг/л НОК, 0,1 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування 42 доби при температурі 23 °С та фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Встановлено, що приріст калюсної біомаси становить 35 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 42 добу культивування. Приріст калюсної біомаси залежав від співвідношення і концентрації регуляторів росту та типу експланту. При дослідженні культивування *in vitro Delphinium elatum* L. встановлено, що оптимальним середовищем для культивування є живильне середовище МС з додаванням 1,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК і 0,5 мг/л К. Тривалість культивування складає 50 діб при температурі 25°C і фотоперіоді 16/8 (світло/темрява), освітленні 2000 лк і відносній вологості 70%. Приріст калюсної біомаси складає 94 г сухої речовини на 1 л живильного середовища. При отриманні калюсної біомаси *Pulsatilla alba* Reichenb оптимальним для культивування є живильне середовище МС з додаванням регуляторів росту – 4,0 мг/л НОК і 1,0 мг/л К. Тривалість культивування складає 40 діб при температурі 25°C та 16 годинному фотоперіоді 16/8 (світло/темрява). Приріст біомаси складає 68 г сухої речовини на 1 л живильного середовища на 40 добу культивування. Ріст калюсної біомаси залежав від співвідношення та концентрації регуляторів росту та типу експланту.

Вперше встановлені оптимальні умови виділення комплексу БАР з КБ рослини родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb.

Встановлено оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Anemone nemorosa* L., а саме: подрібнення до розмірів частинок сировини 1-2 мм, як для КБ, так і для ЛРС, екстрагування 40% спиртом етиловим протягом 90 хв в колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $15,81 \pm 0,98$ %, з КБ - $15,83 \pm 0,92$ % становив $4,62 \pm 0,06$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,62 \pm 0,6$ %, з КБ - $4,61 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

Вибрано наступні оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Delphinium elatum* L.: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС та 2-3 мм для КБ, екстрагування 40% етиловим спиртом у колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 90 хв при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:20. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $11,81 \pm 0,38$ %, з КБ - $11,83 \pm 0,62$ %; поліфенолів з ЛРС - $4,52 \pm 0,06$ %, з КБ - $4,51 \pm 0,08$ % у перерахунку на суху речовину.

Встановлено наступні оптимальні умови одержання екстрактів з ЛРС (трави) та КБ *Pulsatilla alba* Reichenb.: подрібнення сировини до розмірів частинок 1-2 мм для ЛРС і 3-5 мм для КБ, екстрагування 70% етиловим спиртом в колбі зі зворотнім холодильником на водяному нагрівачі протягом 120 хв. при співвідношенні між сировиною та екстрагентом 1:10. За цих умов вміст екстрагованих БАР з ЛРС становив $8,04 \pm 0,07$ %, з КБ - $8,01 \pm 0,27$ %; поліфенолів з ЛРС - $2,66 \pm 0,01$ %, з КБ - $2,68 \pm 0,19$ % у перерахунку на суху речовину.

В екстрактах з *Anemone nemorosa* L. *Delphinium elatum* L. *Pulsatilla alba* Reichenb. встановлено наявність фенольних сполук: флавоноїдів,

дубильних речовин, гідроксикоричних кислот, гідрохінон похідних, алкалоїдів, антоціанів; Ці сполуки присутні як в екстрактах з ЛРС, так і в екстрактах з КБ.

Визначено аналітичними методами у зразках екстрактів сумарний вміст фенольних сполук: $1,2289 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $1,2186 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,6230 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $2,4478 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *D. elatum* L., $4,4631 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $4,2502 \pm 0,01$ мг/мл у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст флавоноїдів: $0,0350 \pm 0,01$ мг/мл у ЛРС і $0,0324 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *A. nemorosa* L., $2,0389 \pm 0,01$ у ЛРС і $1,9883 \pm 0,02$ у КБ *D. elatum* L., $3,7603 \pm 0,02$ мг/мл у ЛРС і $3,4785 \pm 0,02$ мг/мл у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст дубильних речовин: $1,46 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $1,50 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $3,28 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $3,16 \pm 0,03\%$ у КБ *D. elatum* L., $2,04 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $2,00 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.; сумарний вміст гідроксикоричних: $1,71 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $1,69 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $2,06 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $2,09 \pm 0,03\%$ у КБ *D. elatum* L., $3,09 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $2,98 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.; сумарний вміст гідрохінонпохідних: $0,47 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,45 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $1,71 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $1,68 \pm 0,02\%$ у КБ *D. elatum* L., $0,96 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,91 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.; вміст антоціанів $0,032 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,029 \pm 0,02\%$ у КБ *A. nemorosa* L., $0,050 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,043 \pm 0,03\%$ у КБ *D. elatum* L., $0,024 \pm 0,02\%$ у ЛРС і $0,022 \pm 0,02\%$ у КБ *P. alba* Reichenb.

Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ГРХ, ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

Досліджено компонентний склад летких фракцій екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз. Вміст виявлених речовин в екстрактах КБ *Anemone nemorosa* L. (ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени) є достатнім та практично рівноцінним з вмістом виявлених БАР в екстрактах ЛРС, що дозволяє використання КБ як сировини для одержання БАР. Визначені речовини в екстрактах КБ та ЛРС *D. elatum*, *P. alba* є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

Проведено порівняльний аналіз вмісту фенольних сполук у екстрактах КБ та ЛРС методами ВЕРХ та ТШХ. За результатами ТШХ в екстрактах ЛРС і КБ *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba* ідентифіковані в екстрактах КБ сполуки є такими ж, як сполуки в екстрактах ЛРС. Методом ВЕРХ у екстрактах КБ та ЛРС *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum* та *Pulsatilla alba* визначено практично рівноцінний якісний і кількісний вміст сполук фенольного характеру, що потенційно дозволяє вважати КБ альтернативною сировиною для одержання БАР.

Досліджено компонентний склад летких фракцій екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. та проведено їх порівняльний аналіз методом ГРХ. В досліджуваних екстрактах *Anemone nemorosa* L. ідентифіковано 32 сполуки: парафінові вуглеводні, естери, альдегіди жирних кислот та терпени; в екстрактах *Pulsatilla alba* Reichenb. - ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, похідні тіазолу, бенздіазипіну, нафталіну та терпену; в досліджуваних екстрактах *Delphinium elatum* L. ідентифіковано 38 летких сполук: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот, аміди, монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани), похідні морфіну, нафталіну, тіазолу, бенздіазипіну та невелика кількість терпену. Визначені

речовини у складі летких фракцій КБ та ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. є в достатній кількості, проте відрізняються за компонентним складом.

Результати дослідження гострої токсичності екстрактів рослинної сировини і калюсної біомаси *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. свідчать про відсутність будь-яких токсичних проявів при внутрішньошлунковому введенні в дозах 5000, 10000 та 15000 мг/кг на білих щурах, що дозволяє віднести їх до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

На підставі вивчення гепатопротекторної дії екстрактів ЛРС і КБ *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba* в експериментах *in vivo* на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу встановлено що екстракти А-2, А-21, D-2, D-21, D-3, D-31 не проявили гепатопротекторного ефекту, тоді як, екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31 виявляли помірні гепатопротекторні властивості та частково сприяли нормалізації функції печінки і могли б бути ефективним в якості профілактичного лікарського засобу для тривалого застосування при токсичних ураженнях.

Досліджено гіпоазотемічну активність екстрактів КБ і ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. Встановлено, що тестовані екстракти володіють виразним діуретичним ефектом та позитивним впливом на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. При застосуванні тестованих екстрактів відмічено динаміку до покращення функції нирок, про що свідчить нормалізація рівнів іонізованого натрію як в плазмі крові так і сечі дослідних тварин.

Серед тестованих екстрактів ЛРС і КБ *P. alba* найкращий рівень протизапальної активності мали зразки С-3 та С-31, показники пригнічення запальної реакції яких становили 27% та 26,2% відповідно, що дещо поступається референс-препаратам (на 10 та 17 % кетанов та

диклофенаку натрію, відповідно), проте є доволі хорошим показником для рослинних протизапальних засобів. Задовільний рівень антиексудативного ефекту також проявили екстракти *D. elatum* L. D-3 та D-31, які мають показники пригнічення запального процесу 17,4 та 17,03% відповідно.

Всі досліджувані екстракти мають антиоксидантні властивості, оскільки їх дія проявлялась у зниженні маркерів радикал поглинальної активності. При проведенні дослідження антиоксидантної активності екстрактів встановлено, що найбільшу ступінь інактивації ДФПГ проявляють 40% спиртові екстракти екстракти *D. elatum*, *P. alba* та екстракти *A. nemorosa* виготовлені з використанням 70% етанолу.

Вивчено протимікробну та протигрибкову активність екстрактів ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. на 10 референс-культурах та 4 клінічних ізолятах мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з інфекціями пов'язаними з наданням медичної допомоги. Відповідно до кількісних показників результатів дослідження найбільш виражену протимікробну дію проявили екстракти КБ та ЛРС *D. elatum* L. Встановлено, що кращу протигрибкову дію проявили 70% екстракти ЛРС та КБ *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb.

Вивчено інгібуючу дію досліджуваних екстрактів на агрегацію тромбоцитів. Найкращий результат антитромботичної активності показали екстракти А-3, А-31, С-2, С-21, С-3, С-31, які при розведенні у 2 рази інгібували АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів не менше ніж на половину.

На основі проведених фітохімічних, фармакологічних, біотехнологічних досліджень доведено можливість та доцільність використання КБ досліджуваних видів рослин як рівноцінної лікарської сировини.

Здійснено стандартизацію одержаних калюсних біомас та екстрактів *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. Результати

експериментальних досліджень впроваджені в навчальний процес вищих навчальних закладів.

Ключові слова: *Ranunculaceae*, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., калюсна біомаса, екстракт, біологічна активність і фармакологічна дія.

ANNOTATION

Khropot O. S. The use of plants of the family *Ranunculaceae* to obtain biologically active substances in the *in vitro* system. - Qualification work on the rights of the manuscript.

The dissertation on achieving the scientific degree of Doctor of Philosophy, specialty 226 - Pharmacy, industrial pharmacy. - Lviv Polytechnic National University, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to obtaining the callus biomass of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* introduced into a culture *in vitro*, their complex phytochemical study, and determination of their pharmacological activity.

According to the analysis of scientific publications, plants of the *Ranunculaceae* family, in particular, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. (*Pulsatilla scherfelii*) contain a significant amount of biologically active substances and characterized by numerous pharmacological activities. These plants have long been used in folk medicine and are promising raw materials for the production of phytopreparations. However, these medicinal plants are rare species, stocks of their raw materials are limited, and medicinal preparations based on *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. are absent in the Ukrainian market of drugs. An alternative source of biomass and BAS produced by these plants is *in vitro* cultivation. The use of the cell culture method makes it possible to regulate the callus biomass accumulation, optimize growing conditions to increase the amount of the target

product, as well as to standardize the composition of both medicinal raw materials and finished phytopreparations.

For the first time for a plant of the family Ranunculaceae: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., and *Pulsatilla alba* Reichenb., biotechnological approaches to the production of BAS *in vitro* have been developed and scientifically substantiated. Sterilizing agents have been selected for maximum obtaining of viable explants. The influence of growth regulators on callus biomass was studied, cultivation conditions were developed for each plant and the highest callus biomass yield, stratification and sterilization schemes, growth regulators, and their concentration were selected, CB from root, leaf, stem, petiole explants were obtained.

For *in vitro* cultivation of *Anemone nemorosa* L. it has found that the optimal medium is a nutrient medium Murashige-Skoog (MS) with 1.0 mg / l IOC, 0.2 mg / l NOC, 0.1 mg / l 2,4-D, and 0.5 mg / l K. The duration of cultivation was 42 days at a temperature of 23 °C and a photoperiod of 16/8 (light/dark). It was revealed that the increase of callus biomass is 35 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium for 42 days of cultivation. The increase of callus biomass depended on the ratio and concentration of growth regulators and the type of explant. For *in vitro* cultivation of *Delphinium elatum* L. the optimal medium was a nutrient medium MS with the addition of 1.0 mg / l IOC, 0.2 mg / l NOC, and 0.5 mg / l K. The duration of cultivation was 50 days at a temperature of 25 °C and a photoperiod of 16/8 (light/dark), illumination of 2000 lux and relative humidity of 70%. The increase of callus biomass was 94 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium. For obtaining of callus biomass of *Pulsatilla alba* optimal is a nutrient medium MS with the addition of growth regulators - 4.0 mg / l NOC and 1.0 mg / l K. The duration of cultivation was 40 days at a temperature of 25 °C and 16-hour photoperiod 16 / 8 (light/dark). The increase of biomass was 68 g of dry matter per 1 liter of nutrient medium for 40 days of

cultivation. The growth of callus biomass depended on the ratio and concentration of growth regulators and the type of explant.

For the first time, the optimal conditions for the isolation of the BAS complex from the CB of plants of the *Ranunculaceae* family: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., and *Pulsatilla alba* Reichenb. were developed.

The optimal conditions for obtaining extracts from medicinal plant raw materials (MPRM) (grass) and CB *Anemone nemorosa* L., namely: grinding to a particle size of 1-2 mm, for both CB and MPRM, extraction with 40% ethyl alcohol for 90 minutes in a flask on a water heater under reflux at a ratio 1:20 (raw material/extractant). Under these conditions, the content of extracted BAS from LRS MPRM was $15.81 \pm 0.98\%$, from CB - $15.83 \pm 0.92\%$; polyphenols with MPRM - $4.62 \pm 0.06\%$, with CB - $4.61 \pm 0.08\%$ in terms of dry matter.

The optimal conditions for obtaining extracts from MPRM (grass) and CB *Pulsatilla alba* Reichenb. are as follows: grinding of raw materials to particle sizes of 1-2 mm for MPRM and 3-5 mm for CB, extraction with 70% ethyl alcohol in a flask on a water heater under reflux for 120 min at a ratio 1:10 (raw material/extractant). Under these conditions, the content of extracted BAS from MPRM was $8.04 \pm 0.07\%$, from CB - $8.01 \pm 0.27\%$; polyphenols from MPRM - $2.66 \pm 0.01\%$, from CB - $2.68 \pm 0.19\%$ in terms of dry matter.

There are such phenolic compounds as flavonoids, tannins, hydroxycinnamic acids, hydroquinone derivatives, alkaloids, and anthocyanins in the extracts of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. These compounds are present in both MPRM and CB extracts.

The total content of phenolic compounds in the extracts was determined by analytical methods: $1,2289 \pm 0,01$ mg / ml in MPRM and $1,2186 \pm 0,02$ mg / ml in CB *A. nemorosa* L., $2,6230 \pm 0.02$ mg / ml in MPRM and $2,4478 \pm 0.01$ mg / ml in CB *D. elatum* L., $4,4631 \pm 0.02$ mg / ml in MPRM and $4,2502 \pm 0.01$ mg / ml in CB *P. alba* Reichenb.; flavonoid content: 0.0350 ± 0.01 mg / ml in MPRM and 0.0324 ± 0.02 mg / ml in CB *A. nemorosa* L., $2,0389 \pm 0.01$ in

MPRM and 1.9883 ± 0.02 in CB *D. elatum* L., 3.7603 ± 0.02 mg / ml in MPRM and 3.4785 ± 0.02 mg / ml in CB *P. alba* Reichenb.; tannin content: $1.46 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.50 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $3.28 \pm 0.02\%$ in MPRM and $3.16 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $2.04 \pm 0.02 \%$ in MPRM and $2.00 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; total hydroxycinnamic content: $1.71 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.69 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $2.06 \pm 0.02\%$ in MPRM and $2.09 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $3.09 \pm 0.02\%$ in MPRM and $2.98 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; total content of hydroquinone derivatives: $0.47 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.45 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $1.71 \pm 0.02\%$ in MPRM and $1.68 \pm 0.02\%$ in CB *D. elatum* L., $0.96 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.91 \pm 0.02\%$ in CB *P. alba* Reichenb.; anthocyanin content $0.032 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.029 \pm 0.02\%$ in CB *A. nemorosa* L., $0.050 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.043 \pm 0.03\%$ in CB *D. elatum* L., $0.024 \pm 0.02\%$ in MPRM and $0.022 \pm 0.02\%$ in *P. alba* Reichenb.

A comparative analysis of the phenolic compounds in CB and MPRM extracts by high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC) was performed. According to the results of TLC identified compounds in the extracts of CB are the same as the compounds in the extracts of MPRM from *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb.

The almost equivalent qualitative and quantitative content of phenolic compounds was determined by HPLC method in the extracts of CB and MPRM, which potentially allows considering CB as an alternative raw material for the production of BAS.

The composition of volatile fractions of MPRM and CB extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. was studied and their comparative analysis was performed. The content of detected substances in the extracts of CB of *Anemone nemorosa* L. (identified 32 compounds: paraffinic hydrocarbons, esters, aldehydes of fatty acids and terpenes) is sufficient and almost equivalent to the content of detected BAS in MPRM extracts, that allows

the use of CB as a raw material for BAS obtaining. Certain substances in the extracts of CB and MPRM *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* are insufficient quantities but differ in their composition. A comparative analysis of the content of phenolic compounds in the extracts of CB and MPRM was conducted by HPLC and TLC. According to the results of TLC, the compounds identified in the extracts of CB are the same as the compounds in the extracts of MPRM from *Anemone nemorosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*.

The almost equivalent qualitative and quantitative content of phenolic compounds was determined by HPLC in extracts of CB and MPRM of *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. and *Pulsatilla alba* Reichenb., which potentially allows considering CB as an alternative raw material for the production of BAS.

The composition of volatile fractions of MPRM and CB extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. was studied and their comparative analysis was performed by GC method. In the studied extracts of *Anemone nemorosa* L. 32 compounds were identified: paraffinic hydrocarbons, esters, fatty acid aldehydes and terpenes.

38 volatile compounds were identified in *Pulsatilla alba* Reichenb. extracts: higher fatty acids, fatty acid esters, monocyclic and bicyclic monoterpenoids, saturated hydrocarbons (alkanes), morphine derivatives, thiazole derivatives, benzodiazepine, naphthalene and terpene. 38 volatile compounds were identified in the studied extracts of *Delphinium elatum* L.: higher fatty acids, fatty acid esters, amides, monoterpenoids, saturated hydrocarbons (alkanes), derivatives of morphine, naphthalene, thiazole, benzodiazepine and a small amount of terpene. Certain substances in the volatile fractions of CB and MPRM of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. are in sufficient quantities but differ in their composition. The study of acute toxicity of plant raw material extracts and callus biomass of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb. indicate the absence of any toxic manifestations in

white rats after administration intragastrically at doses of 5000, 10000 and 15000 mg/kg, that allows to carry them to the VI class of toxicity (rather harmless substances).

The hepatoprotective effect of extracts of MPRM and CB of *Anemone nemosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* were studied in experiments in vivo on a model of carbon tetrachloride acute toxic hepatitis. These results did not show a hepatoprotective effect for extracts A-2, A-21, D-2, D-21, D-3, D-31, whereas extracts A-3, A-31, C-2, C-21, C-3, C-31 had a moderate hepatoprotective effect and partially normalized the liver function. Therefore, these extracts could be effective as a prophylactic preparation for long-term use in toxic lesions.

The hypoazotemic activity of CB and MPRM extracts of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. was studied. It was found that the tested extracts have a pronounced diuretic effect and positively influenced the excretion of nitrogenous metabolites of urea and creatinine in white rats. After using the tested extracts, the dynamics to the improvement of renal function was noted, as evidenced by the normalization of ionized sodium levels in both blood plasma and urine of experimental animals.

Among the tested extracts of MPRM and CB *P. alba*, the best anti-inflammatory activity was found for samples C-3 and C-31, the level of suppression of the inflammatory response was 27% and 26.2%, respectively. These result is slightly inferior to reference drugs (10 and 17% for ketanov and diclofenac sodium, respectively), but is good for herbal anti-inflammatory drugs. The anti-exudative effect was also shown for extracts of *D. elatum* L. D-3 and D-31, which suppress the inflammatory process on 17.4 and 17.03%, respectively.

The study of the antioxidant activity of extracts of MPRM and CB of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. has found that the highest

degree of inactivation of DFPG was for 40% alcohol extracts of *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba*, and 70% ethanol extracts of *Anemone nemorosa*.

The antimicrobial and antifungal activity of extracts of MPRM and CB of *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., and *P. alba* Reichenb. on 10 reference cultures and 4 clinical isolates from patients with infections related to medical care were studied. According to the quantitative indicators of the results of the study, the most pronounced antimicrobial effect was shown in extracts of CB and MPRM of *D. elatum* L. It was found that the best antifungal effect was found for 70% extracts of MPRM and CB of *D. elatum* L. and *P. alba* Reichenb.

The inhibitory effect of the studied extracts on platelet aggregation was studied. The best result of antithrombotic activity was shown in extracts A-3, A-31, C-2, C-21, C-3, C-31. These twice-diluted extracts inhibited ADP-dependent platelet aggregation by at least half.

The possibility and expediency of using the CB of the studied plants as equivalent medicinal raw materials is proved based on the phytochemical, pharmacological, and biotechnological studies.

The results of experimental study are introduced into the educational process of higher educational institutions.

Key words: *Ranunculaceae*, *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., callus biomass, extract, biological activity and pharmacological effect.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Konechna R., Khropot O., Petrina R., Kurka M., Gubriy Z., Novikov V. Research of antioxidant properties of extracts of the plants and the callus biomass // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2017. – Том 10 № 7. – С. 182–185. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, узагальнення та обробка одержаних результатів, підготовка статті*), *Scopus*.

2. Khropot O., Konechnyi Y., Polish N., Konechna R., Bazavluk Y., Korniychuk O., Novikov V. The study of the composition of chloroform fraction of *Anemone nemorosa* L. // *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 7, iss. 2. – P. 153–159. (Особистий внесок здобувача: проведення процесу екстракції, аналіз результатів, написання статті), **Web of Science**

3. Лук'янчук А., Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Анемона дібровна. *Anemone nemorosa* L. Аналітичний огляд // *ScienceRise. Pharmaceutical Science*. – 2017. – № 3 (7). – С. 38–42. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел і теоретичні відомості про сировину, оформлення статті).

4. Хропот О. С., Конечний Ю. Т., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Голота С. М., Пошивак О. Б., Нектегаєв І. О., Піняжко О. Р., Новіков В. П. Вивчення гострої токсичності та протизапальної активності спиртових екстрактів трави сну білого (*Pulsatilla alba*) // *Фармацевтичний часопис*. – 2019. – № 2 (50). – С. 60–66. (Особистий внесок здобувача: брала участь у пробопідготовці зразків сировини, аналіз літературних джерел та результатів дослідження, оформлення матеріалів статті).

5. О. Хропот, Є. Базавлук, Р. Конечна, І. Губицька, Ю. Конечний, І. Ясіцька-Місяк, П. Вечорек, В. Новіков. Одержання та дослідження калюсної маси *Delphinium elatum* // *Фармацевтичний часопис*. – 2020. – №2. – С. 5–15. (Особистий внесок здобувача: брала участь у пробопідготовці зразків сировини, проведенні експериментальних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).

6. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Червцова В. Г., Новіков В. П. Введення в культуру *in vitro* *Delphinium elatum* та перспективи використання калюсної біомаси в гомеопатії // *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*. – 2017. – Том 2. – С. 58–61. (Особистий внесок здобувача:

аналіз літературних джерел, вирощування калосу, оформлення результатів).

7. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П., Ясіцка-Місяк І., Вечорек П. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Anemone nemorosa* // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. – 2017. – Том 3. – С. 171–173. (Особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, оформлення статті).

8. Гриців С. В., Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Петріна Р. О., Новіков В. П. Культивування деяких рідкісних та зникаючих видів лікарської флори Українських Карпат в умовах *in vitro* // Хімічна технологія та інженерія : збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції (Україна, Львів, 26–30 червня 2017 р.). – 2017. – С. 406–407. (Особистий внесок здобувача: культивування рослин в умовах *in vitro*).

9. Гриців С. В., Колб Ю. І., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Альтернативний біотехнологічний метод одержання біомаси *Delphinium elatum* // Біологічні дослідження – 2017 : збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (14–16 березня 2017). – 2017. – С. 332–333. (Особистий внесок здобувача: підір умов для одержання біомаси та оформлення тез).

10. Lukianchuk A., Shikula S., Khropot O., Konechnyi Y., Namada V., Konechna R., Mylianych A., Korniychuk O., Novikov V. Antimicrobial activity of extracts of windflower (*Anemone nemorosa* L.) // Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє: збірник наукових праць міжнародної науково-практичної конференції (29–30 вересня 2017 р., Харків). – 2017. – С. 11–12. (Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності анемони та оформлення тез згідно з вимогами).

11. Гриців С., Хропот О., Конечна Р., Петріна Р. Культивування рослин родини *Ranunculaceae* // Біотехнологія XXI століття : матеріали XI Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) (Київ, 21 квітня 2017 р.). – 2017. – С. 24. (Особистий внесок здобувача: підір умов для культивування рослин).

12. Лук'янчук А. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Курка М. С., Новіков В. П. Використання *Anemone nemorosa* в фармакотерапії захворювань людини, проблеми та перспективи // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 202. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез згідно вимог).

13. Колб Ю. І., Гриців С. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П. Перспективи використання калусної біомаси *Pulsatilla alba* у фармації // Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції (Харків, 30–31 березня 2017 р.). – 2017. – С. 165–166. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та отримання калюсів).

14. Гриців С. В., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Біотехнологічне дослідження *Delphinium elatum* // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 279–280. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел та підготовка тез до друку згідно вимог).

15. Колб Ю. І., Конечна Р. Т., Хропот О. С., Новіков В. П. Можливість застосування *Pulsatilla alba* у косметології та фармації // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів

створення лікарських препаратів : матеріали VI Науково-практичної конференції з міжнародною участю (10–11 листопада 2016 р., Тернопіль). – 2016. – С. 284. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

16. Хропот О. С., Конечна Р. Т., Конечний Ю. Т., Шикула С. І., Тимчук І. В. Протимікробна активність *Delphinium elatum* L. // Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Чернівці, 29 січня 2018 року). – 2018. – С. 126–128. (*Особистий внесок здобувача: вивчення протимікробної активності*).

17. Конечний Ю. Т., Хропот О. С., Базавлук Є. В., Гамада В. Р., Корнійчук О. П., Шикула Р. Г., Конечна Р. Т., Журахівська Л. Р., Новіков В. П. Дослідження фенольних сполук та антимікробної дії *Anemone nemorosa* L. // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю (Тернопіль, 27–28 вересня 2018 р.). – 2018. – С. 25–27. (*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності та дослідження вмісту фенольних сполук*).

18. Гамада В. Р., Хропот О. С., Крвавич А. С., Конечна Р. Т., Новіков В. П. Аспекти біотехнології у розробці нових функціональних харчових продуктів // Стан і перспективи харчової науки та промисловості: тези доповідей V Міжнародної науково-технічної конференції, 10–11 жовтня 2019 р., Тернопіль. – 2019. – С. 126–127. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел*).

19. Базавлук Є. В., Хропот О. С., Конечна Р. Т., Губицька І. І., Новіков В. П. Дослідження вмісту фенольних сполук *Delphinium elatum* L. // Сучасні досягнення фармацевтичної науки в створенні та стандартизації лікарських засобів і дієтичних добавок, що містять компоненти природного походження : матеріали II Міжнародної науково-практичної

інтернет-конференції, 11 березня 2020 року, м. Харків. – 2020. – С. 21–22.
(*Особистий внесок здобувача: дослідження вмісту фенольних сполук*).

20. Базавлук Є.В., Хропот О.С., Конечна Р.Т., Новіков В.П., Шикуча С.І., Конечний Ю.Т. Оцінка антимікробного потенціалу *Delphinium elatum* L. // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances: матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 23-25 квітня 2020, м. Київ, 2020 – С.88-91.
(*Особистий внесок здобувача: вивчення антимікробної активності*).