

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Акрітїду Христини на тему «Фармакогностичне дослідження люпину багатолістого», представлену до спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність. Пошук нових перспективних джерел БАР, комплексне фармакогностичне вивчення нових видів лікарської рослинної сировини, створення на їх основі субстанцій різного напрямку фармакологічної дії є актуальним завданням сучасної фармації.

Перспективним є дослідження люпину багатолістого – *Lupinus polyphyllus* Lindl. родини Бобові – *Fabacea*, який культивують як декоративну, сидератну, харчову і кормову рослину. Актуальним є дослідження низькоалкалоїдних видів люпину, враховуючи вміст в насінні, траві і коренях білка, жирів, вітамінів, макро- і мікроелементів. Пелюстки квіток є офіційними в 12 країнах, насіння, листки використовують в народній медицині багатьох країн.

Недостатнє хімічне вивчення біологічно активних речовин, відсутність параметрів стандартизації сировини люпину стали підставою для проведення поглибленого фармакогностичного дослідження насіння, трави і коренів люпину.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ України і є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (номер державної реєстрації 0103U000476, термін дії - 2003 - 2013 рр.) та «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946, термін дії - 2014 - 2018 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, їх достовірність. Представлена дисертаційна робота виконана з використанням сучасних методів фармакогностичного аналізу: хроматографічних, спектрофотометричних, фізико-хімічних. Хімічну будову

виділених сполук встановлювали на підставі їх хімічних перетворень, даних ПМР-, УФ- та ІЧ-спектрів у порівнянні з референт-зразками, за температурою плавлення та показником заломлення. Основні положення дисертації базуються на результатах експериментальних досліджень, висновки яких логічно витікають з проведених експериментів і не викликають сумніву. Кількість наведених результатів досліджень, глибина їх аналізу, проведених з застосуванням методів математичної статистики, є науково достовірними та достатніми для одержання обґрунтованих висновків.

Наукова новизна одержаних результатів та обґрунтованість основних положень. Автором вперше проведено комплексне фітохімічне вивчення БАР сировини люпину багатolistого. В траві, насінні і коренях якісними реакціями, ПХ, ТШХ встановлено наявність вуглеводів, амінокислот, гідроксикоричних і органічних кислот, хінолізидинових алкалоїдів, дубильних речовин, флавоноїдів, ізофлавоноїдів і кумаринів.

Методом атомно-абсорбційної спектроскопії в траві, насінні і коренях люпину багатolistого ідентифіковано 15 макро- та мікроелементів та визначено їх вміст. Встановлено, що серед макроелементів у рослині переважали Ca, K, Si, Mg, P і Na, а серед мікроелементів – Zn, Sr, Cu і Mn.

Дисертантом вперше методом газорідинної хроматографії у траві люпину ідентифіковано та встановлено вміст 16 жирних кислот, в насінні і коренях 15. У всіх досліджуваних об'єктах переважали: лінолева, ліноленова, олеїнова і пальмітинова кислоти.

Методом хромато-мас-спектроскопії в досліджуваних органах люпину багатolistого було виявлено 57 летких сполук: у траві – 31 сполука, у насінні – 28 сполук, у коренях – 20 летких речовин. Домінуючим компонентом в усіх досліджуваних зразках сировини був сквален.

За допомогою амінокислотного аналізатора проведено порівняльний амінокислотний аналіз сировини люпину багатolistого і визначено 15 амінокислот, 8 з яких є незамінними. Загальна концентрація амінокислот (ваг.%) у траві – 19,96, у насінні – 31,42, у коренях – 12,67 відповідно. За вмістом незамінних амінокислот (57,59 - 62,64 %) люпин багатolistий значно перевищує інші зернобобові культури, де цей показник знаходиться в межах 35 – 50 %. Максимальний вміст незамінних амінокислот встановлено у коренях.

Методом хромато-мас-спектроскопії встановлено наявність 36 органічних кислот, серед яких 10 – карбонових, 7 – ароматичних і 19 –

жирних кислот. Специфічними кислотами для трави є: гентизинова, для насіння – хенейкозанова, для коренів – гептил-2,4-дієнова, 11-октадеценена, нонанова та ізолимонна.

Методом амперометричного титрування проведено порівняльний аналіз вмісту суми хінолізидинових алкалоїдів люпину багатолістого, який становить: у траві – 0,28%, у насінні – 0,56% і в коренях – 0,24% відповідно. Новизна методики визначення суми алкалоїдів підтверджена патентами України на корисну модель № 101056 «Спосіб кількісного визначення пахікарпіну» та № 101061 «Спосіб кількісного визначення суми хінолізидинових алкалоїдів люпину багатолістого».

Методом ВЕРХ у коренях люпину багатолістого виявлено 10 речовин фенольної природи: хлорогенову кислоту, кумарин, апігенін, катехін, епікатехін, а також галову і елагову кислоти, катехінгалат, епікатехінгалат і епігалокатехін. У кількісному відношенні переважали (%): кумарин (0,67), катехін (0,49), елагова кислота (0,37), епігалокатехін (0,36) і апігенін (0,35).

З коренів люпину багатолістого виділено 6 фенольних сполук і на основі фізико-хімічних властивостей виділених речовин і продуктів їх хімічних перетворень, даних УФ-, ІЧ-, ПМР-спектроскопії, порівнянням з референт-зразками встановлена їх структура: ферулова і хлорогенова кислоти, кумарин, апігенін, апігенін-7-О-D-глюкозид і геністеїн.

Вперше отримано сухий екстракт коренів люпину багатолістого, для якого було визначено гостру токсичність та встановлено його анаболічну та актопротекторну активність. Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 93789 «Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з анаболічною та актопротекторною дією».

Розроблено технологію одержання сухого екстракту насіння люпину багатолістого, для якого визначено гостру токсичність та встановлено його антимікробну активність.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених фітохімічних і фармакологічних досліджень доведена можливість використання коренів і насіння люпину багатолістого як лікарської рослинної сировини. Розроблено технології одержання сухого екстракту коренів люпину багатолістого з актопротекторною, анаболічною активністю і сухого екстракту насіння з антимікробної активністю. Вперше розроблено проекти МКЯ на «Люпину багатолістого корені» і «Люпину багатолістого коренів екстракт сухий».

Результати досліджень впроваджені в наукову роботу та навчальний процес профільних кафедр ВНЗ України: кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України»; кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків ФПО Запорізького медичного університету; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті, а також їх апробації. За темою дисертації опубліковано 18 наукових праць, у тому числі 9 статей у наукових виданнях України та інших держав (6 з яких – у фахових виданнях зарубіжних країн, 1 стаття в інтернет-виданні), 6 тез доповідей, отримано 3 патенти України на корисну модель. Опубліковані роботи і автореферат повністю відповідають основним результатам досліджень.

Результати дисертаційної роботи апробовані на 9 конференціях, включаючи 4 закордонні.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, трьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел літератури, додатків. Дисертацію викладено на 173 сторінках друкованого тексту, обсяг основного тексту становить 141 сторінки. Автор підтверджує результати експериментальних досліджень значним ілюстративним матеріалом – 31 рисунками, 34 таблицями та 3 схемами. Список використаних джерел включає 183 найменування, з них 147 кирилицею та 36 латиною.

У вступі (обсяг – 8 стор.) обґрунтовується актуальність обраної теми, формулюються мета та завдання досліджень, відзначаються наукова новизна та практична значимість отриманих результатів.

У першому розділі (обсяг – 22 стор.) дисертантом проведено критичний аналіз наукових першоджерел стосовно сучасного стану вивчення рослин роду Люпин. Автор наводить ботанічну характеристику, відомості про поширення, культивування та інтродукцію, хімічний склад, біологічну активність і застосування люпину в медицині та народному господарстві.

Автор робить висновок про перспективність дослідження люпину багатолістого для застосування у медичній та фармацевтичній практиці як

лікарські засоби, що знижують ризик онкозахворювань, хвороб серця, запобігають розвитку катаракти, цукрового діабету та ожиріння. Це створює передумови для проведення фітохімічних і фармакологічних досліджень даної рослини з метою створення нових лікувальних і профілактичних засобів.

У другому розділі (обсяг – 41 стор., табл – 8, рис. - 9) наведені відомості про прилади, методи дослідження, системи розчинників і реактиви, які використовувались при проведенні досліджень із визначення хімічного складу об'єктів дослідження, методики виділення і встановлення структури індивідуальних речовин, дослідження якісного складу, визначення кількісного вмісту БАР, вивчення гострої токсичності та фармакологічної активності сухих екстрактів коренів і насіння люпину багатолістого.

Автором також наведені результати визначення кількісного вмісту макро- та мікроелементів, сполук, що переганяються з водяною парою, аміно- та органічних кислот, суми хінолізидинових алкалоїдів у сировині люпину багатолістого.

Результати дослідження елементного складу органів люпина багатолістого вказують, що серед макроелементів в рослині переважають: Ca, K, Si, Mg, P і Na, а серед мікроелементів – Zn, Sr, Cu і Mn. Автор зазначає, що трава і корені люпина багатолістого мають більш багатий елементний склад, ніж насіння. Також встановлено, що за вмістом важких металів досліджувані зразки сировини відповідають медико-біологічним і санітарним нормам.

При порівняльному вивченні летких компонентів сировини люпина багатолістого методом хромато-мас-спектроскопії ідентифіковано 57 сполук: терпеноїдів, ароматичних сполук, вищих аліфатичних вуглеводнів та визначено їх кількісний вміст. Встановлено, що найбільший вміст летких компонентів накопичується в коренях 373,87 (мг/кг), серед яких переважають сквален (119,61), гептакозан (85,61) і пентакозан (69,32). Автор робить висновок про можливість використання ефірної олії в парфюмерно-косметичній промисловості для створення нових ароматних композицій.

При дослідженні амінокислотного складу люпина багатолістого автором встановлено наявність не менше 15 амінокислот, 8 з яких є незамінними. Загальна концентрація амінокислот (ваг. %): в траві 19,96, в насінні 31,42 і в коренях 12,67. Визначено вміст вільних і зв'язаних амінокислот (ваг.%): в траві 0,7 і 19,26; в насінні 2,57 і 28,85; в коренях 1,05 і

11,62 відповідно. На основі отриманих результатів автор стверджує, що за вмістом незамінимих амінокислот (57,59 - 62,64 %) люпин багатолістий значно перевищує інші зернобобові культури. Дисертантом встановлено, що значний вміст амінокислот міститься не тільки в насінні і траві рослини, але і в коренях. При цьому в коренях спостерігається максимальний вміст незамінимих амінокислот. Одержані дані свідчать про можливість використання люпину багатолістого при виробництві продуктів харчування та лікувально-профілактичних засобів різної направленості фармакологічної дії.

Методом хромато-мас-спектроскопії вивчено якісний склад і визначено кількісний вміст органічних кислот в траві, насінні і коренях люпина багатолістого. Встановлено наявність 36 органічних кислот, серед яких: 10 – карбонових, 7 – ароматичних і 19 – жирних кислот. Специфічними кислотами для трави є (мг/кг) гентизинова кислота (38,15), для насіння – хенейкозанова кислота (24,66), для коренів – гепта-2,4-дієнова (5619,50), 11-октадеценева (80,41), нонанова (66,52) та ізолимонна (34,10) кислоти. Дисертант стверджує, що зразки сировини вміщують значну кількість органічних кислот, які є проміжним продуктом окислення вуглеводів, жирів, амінокислот і білків, а також використовуються при синтезі алкалоїдів, стероїдів.

Вперше методом амперометричного титрування визначено вміст хінолізидинових алкалоїдів люпина багатолістого, який становить: в траві – 0,28 %, насінні – 0,55 % і коренях – 0,24 %.

Автор вказує, що значний вміст виявлених груп БАР в досліджуваних зразках сировини люпину багатолістого свідчить про перспективність одержання субстанцій з актопротекторною, анаболітичною та антимикробною дією.

Третій розділ (обсяг –28 стор., табл. – 11, рис. – 16) присвячений морфолого-анатомічному та фітохімічному дослідженню коренів люпину багатолістого.

У результаті морфолого-анатомічних досліджень встановлені основні діагностичні ознаки анатомічної будови коренів люпину, визначені числові показники та вміст основних БАР сировини, які використані при розробці проекту методик контролю якості на рослинну сировину "Люпину багатолістого корені".

Методом ВЕРХ у коренях люпину багатолістого виявлено 10 речовин

фенольної природи: хлорогенову кислоту, кумарин, апігенін, катехін, епікатехін, а також галову і елагову кислоти, катехінгалат, епікатехінгаллат і епігалокатехін. У кількісному відношенні переважали (%): кумарин (0,67), катехін (0,49), елагова кислота (0,37), епігалокатехін (0,36) і апігенін (0,35).

З коренів люпину багатolistого виділені 6 фенольних сполук і встановлена їх структура: ферулова і хлорогенова кислоти, кумарин, апігенін, апігенін-7-О-Д-глюкозид і геністеїн.

Четвертий розділ (обсяг – 33 стор., табл. – 15, рис. – 6) присвячений розробці технології одержання біологічно активних субстанцій з коренів і насіння люпину багатolistого, їх дослідженню і стандартизації. Отримано сухий екстракт насіння та сухий екстракт коренів люпину багатolistого, які стандартизовані за вмістом суми хінолізидінових алкалоїдів та для екстракту підземних органів додатково за вмістом дубильних речовин та ізофлавоноїдів. Досліджено гостру токсичність екстрактів. Сухі екстракти насіння і коренів люпину відносяться до класу практично нешкідливих речовин ($LD_{50} > 5000$ мг/кг), сухий екстракт коренів люпину виявляє актопротекторну та анаболічну дію. Сухий екстракт насіння проявляє високу антимікробну активність по відношенню до грамнегативних бактерій. Опрацьовано технологічну схему одержання екстрактів коренів і насіння люпину багатolistого. Показники якості екстракту підземних органів люпину багатolistого включено в розроблений проект МКЯ «Люпину багатolistого коренів екстракт сухий».

Особистий внесок здобувача.

Дисертанту належить вирішальна роль у визначенні мети дослідження, шляхів її реалізації, плануванні та виконанні експерименту, його обробці, інтерпретації та узагальненні одержаних результатів, формуванні основних положень та висновків, що захищаються. У дисертації і наукових працях, опублікованих зі співавторами і особисто автором: встановлено наявність основних груп БАР (вільних і зв'язаних амінокислот, макро- і мікроелементів, органічних, жирних і гідроксикоричних кислот, дубильних речовин, флавоноїдів, ізофлавоноїдів, кумаринів та алкалоїдів); визначено кількісний вміст амінокислот, органічних і жирних кислот, дубильних речовин, ізофлавоноїдів та алкалоїдів; з коренів люпину багатolistого виділені 6 сполук і встановлена їх структура; визначені основні морфолого-анатомічні діагностичні ознаки коренів люпину багатolistого; розроблено технології отримання сухих екстрактів коренів і насіння люпину

багатолистого; розроблено проекти МКЯ «Люпину багатолистого корені» і «Люпину багатолистого коренів екстракт сухий».

Зауваження і пропозиції. Робота Акрітїду Христини відрізняється значним фактичним матеріалом, сучасними методами аналізу, висновки автора ґрунтуються на достовірному фактичному матеріалі.

Проте, поряд з позитивною характеристикою дисертаційної роботи здобувача Акрітїду Христини є ряд зауважень та пропозицій.

В роботі іноді зустрічаються технічні та орфографічні помилки, невдалі або неточні вислови, наприклад: стор. 18, 38, 73, 127.

Деякі літературні джерела були опубліковані понад 10 років тому (1, 11, 16, 30, 80, 138).

Кількісне визначення макро- і мікроелементів доцільно проводити в порівнянні з їх вмістом в ґрунті, що дозволяє встановити закономірності їх нагромадження в траві, насінні та коренях люпину багатолистого.

Кількісний вміст дубильних речовин (танінів) доцільно проводити за методикою ДФУ.

У порядку проведення наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на наступні питання:

В роботі представлено показники якості ЛРС (морфологічні, анатомічні, вміст діючих речовин, числові показники доброякості сировини), що дозволяє ідентифікувати рослинну сировину. При заготівлі культивованої або дикорослої сировини заготівельники використовують інструкцію по заготівлі і сушінню сировини. Які рекомендації щодо заготівлі коренів Ви можете запропонувати?

Вміст алкалоїдів в коренях і насінні люпину багатолистого становить 0,38 % і 0,55 % відповідно, вихід екстрактів становить 22,52 % і 18,18 % відповідно. Чим Ви можете пояснити високий вміст алкалоїдів в екстрактах (2,48 % і 5,79 % відповідно)?

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена 3 патентами на корисну модель, в тому числі і на спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин коренів люпину багатолистого з анаболітичною та актопротекторною дією. Якими є Ваші рекомендації щодо можливого медичного використання екстракту люпину багатолистого?

Проте, вказані недоліки та зауваження не мають принципового характеру і не впливають на наукову, практичну значимість роботи і на загальну позитивну оцінку дисертації.

Висновок про відповідність дисертації вимогам «Порядку присудження наукових ступенів»

На основі вищевикладеного можна зробити висновок, що дисертаційна робота Акрітиду Христини «Фармакогностичне дослідження люпину багатolistого» є завершеною науковою працею і за об'ємом виконаних досліджень, одержаними результатами, їх теоретичним та практичним значенням відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 - фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:
завідувач кафедри фармації
Івано-Франківського національного
медичного університету,
доктор фармацевтичних наук, професор

А.Р. Грицик

