

ВІДГУК

офіційного опонента, доцента кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кандидата біологічних наук Шанайди Марії Іванівни на дисертаційну роботу Яременка Максима Сергійовича «Фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та отримання субстанцій різної біологічної дії», подану до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.017 при Національному фармацевтичному університеті, що утворена наказом МОН № 280 від 03.03.2021 р. для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація»

Актуальність обраної теми досліджень та її зв'язок з науковими програмами, планами та темами

В останні десятиліття на фармацевтичному ринку збільшується попит на фітопрепарати та лікарські засоби з компонентами природного походження, що можна пояснити їх низькою токсичністю, незначною кількістю можливих побічних ефектів та економічною доступністю; при цьому вони не менш ефективні, ніж синтетичні препарати. Для визначення перспективи використання тієї чи іншої лікарської рослинної сировини у виробництві фітопрепаратів необхідно провести її комплексне фармакогностичне дослідження та встановити фармакологічну активність. У зв'язку з цим, питання пошуку нових перспективних рослин чи переосмислення використання вже давно відомих є досить актуальним.

Кореневище лепехи звичайної (*Acorus calamus* L.) в Україні та багатьох країнах світу є офіційною лікарською сировиною, використання якої, однак, обмежене застосуванням у лікуванні та профілактиці захворювань органів травлення. Критичний аналіз наукових першоджерел дав змогу дисертанту з'ясувати перспективність вивчення хімічного складу та біологічної активності не тільки кореневищ рослини, але і її листків. Зважаючи на те, що нормативно-аналітична документація на кореневища лепехи звичайної, яка використовується в Україні, є застарілою, не враховує мінливості хімічного складу залежно від місця зростання рослини, гостро постає питання розробки проєкту монографії «Лепехи звичайної кореневища» та її внесення до Державної фармакопеї України.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (№ держреєстрації 0103U000476) та Проблемної комісії «Фармація» МОЗ і АМН України. Дисертантом особисто проведено фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та розроблено на їх основі нові фітосубстанції.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше проведено комплексне фармакогностичне вивчення листя і кореневищ лепехи звичайної, заготовлених на території України. Проведено порівняльне дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів і встановлено, що вміст ВРПС був вищим у кореневищах рослини. Сумарний вміст амінокислот був більшим у листках.

Уточнено наукові дані стосовно кількісного вмісту та якісного складу летких сполук у листі та кореневищах лепехи звичайної; гаохроматографічним методом у листках виявлено та ідентифіковано 42 сполуки, а в кореневищах – 33. По 18 спільних сполук ідентифіковано в обох досліджуваних об'єктах.

Дисертантом уперше:

- ✓ досліджено вміст і склад фенольних сполук сировини лепехи звичайної з використанням спектрофотометричного та хроматографічних методів;
- ✓ досліджено динаміку накопичення флавоноїдів та ефірної олії в листках рослини залежно від фази вегетації;
- ✓ визначено антирадикальні властивості листків та кореневищ лепехи звичайної, заготовлених на території України. Уточнено наукові дані стосовно вмісту вітамінів, стероїдів та мінеральних сполук у сировині.
- ✓ розроблено сукупну методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону методом тонкошарової хроматографії (ТШХ);
- ✓ розроблено та валідовано методику кількісного визначення азарону методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у перерахунку на α -азарон; хроматографічними методами виявлено, що вміст азарону не перевищує 0,5 % у надземній та підземній частинах рослини;
- ✓ проведено стандартизацію та виявлено основні показники якості листя лепехи звичайної; виділено діагностичні макро- та мікроскопічної ознаки будови надземної та підземної частин рослини;
- ✓ розроблено оптимальні технології одержання екстрактів із кореневищ та листя лепехи звичайної, проведено їх стандартизацію, досліджено склад біологічно активних речовин (БАР) та проведено скринінгове дослідження фармакологічних ефектів отриманих екстрактів.

Практична цінність роботи

Підтверджено значну перспективність використання, крім кореневищ, також листя лепехи звичайної як сировини із відмінним від кореневищ спектром застосування. На основі проведених досліджень визначено основні показники якості листя лепехи звичайної та запропоновано проєкт методик контролю якості «Лепехи звичайної листя». На основі експериментальних даних щодо динаміки накопичення БАР у листі лепехи звичайної оформлено інформаційний лист № 367-2018 «Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus calamus* L.)».

На розроблену методику ідентифікації сировини лепехи звичайної та визначення граничного вмісту азарону оформлено патент України на корисну модель № 133674 «Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону».

На підставі проведених досліджень запропоновано проєкт монографії для ДФУ «Лепехи кореневища^N», який рекомендовано ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» до внесення у ДФУ (акти впровадження №11/1239-5, №11/1240-5, №11/1241-5 від 03.09.2020 р.). Розроблено та валідовано методику кількісного визначення суми азарону методом ВЕРХ у перерахунку на α -азарон. Методику запропоновано для включення до проєкту випробування «Азарон» у лікарській рослинній сировині в процесі перегляду національної монографії на «Лепехи кореневища^N» відповідно до вимог ДФУ та ЄФ (є відповідні акти впровадження).

Фрагменти дисертаційного дослідження стосовно хімічного складу та анатомічної будови підземних і надземних лепехи звичайної запроваджено у навчальний процес 4 профільних кафедр закладів вищої освіти України: кафедри фармакогнозії Національного фармацевтичного університету; кафедри фармакогнозії та ботаніки Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету.

Розроблено технології отримання екстракту листя (підтверджено патентом України № 138526 «Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією») та екстракту кореневищ лепехи звичайної. Розроблено проєкти МКЯ на отримані лікарські рослинні засоби, що були апробовані на ТОВ «КФК «ГРІН ФАРМ КОСМЕТИК».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації та їх достовірність

Встановлені автором наукові положення, висновки та рекомендації, наведені в дисертаційній роботі є повністю обґрунтованими і статистично достовірними та мають практичне значення. Вони забезпечені використанням сучасних фізико-хімічних, фармакогностичних, фармакологічних, технологічних методів дослідження вибраних об'єктів.

Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків

Дисертаційну роботу викладено на 210 сторінках машинописного тексту, вона складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів, загальних висновків, списку джерел літератури і додатків. Обсяг основного тексту становить 159 сторінок. Робота ілюстрована 41 рисунком і 34 таблицями. Список використаної літератури складає 218 найменування, з них кирилицею – 61, латиницею – 157.

У вступі дисертантом визначено актуальність обраної теми, сформульовані мета та завдання досліджень, висвітлено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

У розділі 1 висвітлено сучасний стан фармакогностичного вивчення лепехи звичайної у світовій та вітчизняній науковій літературі. Через застарілість нормативно-аналітичної документації на лепехи звичайної кореневища виникає необхідність у розробці відповідної монографії для внесення до Державної фармакопеї України, з використанням сучасних аналітичних методик. Зроблено висновок про те, що розширення асортименту фітозасобів офіційної медицини за рахунок комплексного фармакогностичного вивчення листя і кореневищ рослини є своєчасним і актуальним.

У розділі 2 на основі критичного аналізу джерел наукової літератури визначено об'єкти та методологію проведення фармакогностичних досліджень. Об'єктами дослідження стали кореневища і листки лепехи звичайної, заготовлені у природних місцях зростання рослин на території України. У цьому розділі також наведено методики, реактиви та прилади, які були використані при проведенні експериментальних досліджень третього, четвертого і п'ятого розділів.

У розділі 3 представлено результати порівняльного аналізу хімічного складу вітчизняних зразків листів та кореневищ лепехи звичайної. Серед БАР первинного синтезу визначено вуглеводний та амінокислотний склад сировини, вміст карбонових кислот. Кількісний вміст летких речовин у листках рослини був у 1,5 раза вищим, ніж у кореневищах. Дослідження якісного складу ефірної олії показало, що у листі лепехи виявлено та ідентифіковано 42 сполуки, тоді як у підземній частині рослини значно менше – 33. При цьому кількісний вміст більшості ідентифікованих сполук знаходився практично на одному рівні.

Методами ТШХ та ВЕРХ у листках *Acorus calamus* ідентифіковано 13 фенольних сполук, у кореневищах – 7. Домінуючим компонентом серед сполук фенольної природи був β -азарон. Ідентифіковано 4 із 10 сполук фенольної природи, що виявляли антирадикальну активність у листі рослини, а саме хлорогенову кислоту, ізоорієнтин, рутин та робінін. У кореневищах виявлено 5 сполук. Проведено дослідження вітамінного складу листя та кореневищ лепехи. Установлено, що вміст вітамінів групи В, РР, каротиноїдів і токоферолів вищий у надземній частині рослини. Уперше ідентифіковано β -ситостерин у вітчизняних зразках лепехи звичайної. Дослідження елементного складу зразків листя і кореневищ показали, що їх домінуючим елементом є калій. Окрім цього, значною мірою накопичуються кальцій, фосфор та силіцій. Вміст важких металів знаходився в межах норми.

У розділі 4 наведено результати досліджень морфолого-анатомічної будови надземних та підземних вегетативних органів лепехи звичайної, методики ідентифікації і встановлення кількісного вмісту азарону в сировині рослин, визначено оптимальні терміни заготівлі листя рослини.

Діагностовано основні мікроскопічні діагностичні ознаки листя рослини вітчизняної заготівлі. Встановлено показники якості кореневищ лепехи, заготовлених у різних регіонах України. Отримані дані використані при розробці монографії ДФУ «Лепехи кореневища». Розроблено МКЯ «Лепехи звичайної листя». Встановлено оптимальні терміни заготівлі листя лепехи звичайної, виходячи з динаміки накопичення БАР – період масового цвітіння. Розроблено методику ідентифікації листків і кореневищ лепехи звичайної за наявності азарону методом ТШХ, а також визначення граничного вмісту цієї сполуки в сировині рослини та лікарських рослинних засобах на її основі. Розроблено методики кількісного визначення азарону методом ВЕТШХ. За матеріалами дослідження оформлено патент України на корисну модель № 133674 «Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону». Розроблено та валідовано методику кількісного визначення азарону в сировині лепехи звичайної та лікарських рослинних засобах методом ВЕРХ. Визначено, що вміст азарону в усіх досліджуваних зразках не перевищує 0,5 %.

Розділ 5 присвячено вивченню оптимальних умови екстрагування та розробці технології отримання екстракту з листя і кореневищ лепехи звичайної, аналізу їх хімічного складу та дослідженню їх біологічної дії екстрактів. Уперше розроблено методику отримання рідкого спиртового екстракту з листя лепехи звичайної, на яку отримано патент на корисну модель та зареєстровано заявку на винахід. Проведено визначення таких технологічних властивостей отриманих рідких екстрактів: в'язкість, показник рН, сухий залишок екстрактів, вміст етанолу та температура кипіння. Досліджено якісний склад та кількісний вміст сполук фенольної природи в екстракті листя лепехи звичайної – всього ідентифіковано 10 сполук. Серед ідентифікованих компонентів домінували β -азарон, робінін та ізоорієнтин. Досліджено якісний склад сполук, що виявляють антирадикальну активність в екстрактах листя та кореневищ рослини. В екстракті кореневищ виявлено 31 сполуку зі здатністю зв'язувати вільні радикали, в екстракті листя - 20 сполук. Методом газорідної хроматографії в екстракті листя лепехи звичайної ідентифіковано 7 сполук, в екстракті кореневищ – 8. Розроблено проекти МКЯ на отримані екстракти. Виявлено протизапальні, жовчогінні, помірні актопротекторні та аналептичні властивості екстракту з листя рослини.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах

За матеріалами дисертації опубліковано 26 наукових робіт, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях, з них 1 у періодичному науковому виданні, яке індексується у наукометричній базі даних Scopus, 17 тез доповідей, 2 патенти України на корисну модель та 1 інформаційний лист.

Апробація результатів дисертації

Результати дисертації були оприлюднені на 17 конференціях різних рівнів – як в Україні, так і за кордоном.

Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації, завершеність дисертації в цілому

Характеризуючи дисертаційну роботу Яременка Максима Сергійовича у цілому, слід зазначити, що вона безперечно містить всі необхідні ознаки актуальності, наукової і практичної значущості. Відрізняється оригінальними сучасними підходами до виконання запланованих експериментальних досліджень. Результати роботи вірогідні. Висновки, зроблені на їх основі, не викликають заперечень.

Дисертаційна робота оформлена згідно до вимог «Порядку присудження наукових ступенів». Принципових зауважень щодо змісту дисертації немає, але при рецензуванні виникли деякі зауваження та пропозиції:

1. У п. 3.1.3 Карбонові кислоти вказано, що дослідження сумарного вмісту вільних органічних кислот та жирної олії у сировині лепехи звичайної проводили методами титриметрії. Однак, вміст жирної олії, відповідно до методики, описаної на стор. 54-55 роботи, визначали гравіметрично.

2. На рис. 3.2 варто було б вказати, у якому порядку знаходяться зони стандартних зразків фенольних сполук на хроматограмах (їхній перелік не зовсім відповідає порядку хроматографічних плям) – наприклад, у порядку зростання показників R_f .

3. У таблиці 3.10 не наведено розшифрування скорочень зразків серій сировини, в яких визначено елементний склад.

4. У розділі 3 визначено вміст і склад полісахаридних фракцій, вітамінів, амінокислотний склад сировини рослин, проте у розділі 5 не наведено інтерпретації цих даних, тобто їхнього можливого впливу на біологічну активність отриманих фітосубстанцій.

5. У роботі мають місце окремі стилістичні помилки, описки та невдалі вирази (одна і та ж сполука названа в різних місцях дисертації по-різному, наприклад: кофейна кислота –кавова кислота; відсутні цифрові позначення на рис. 4.1 тощо).

Вважаю, що помічені неточності є незначними та не знижують дуже позитивного враження від дисертаційної роботи.

Під час ознайомлення із дисертацією виникли деякі дискусійні питання, зокрема:

Які переваги і недоліки заготівлі та застосування досліджуваного Вами триплоїдного (стерильного) цитотипу лепехи звичайної, який широко розповсюджений в Україні, можете назвати у порівнянні з диплоїдним та тетраплоїдним цитотипами?

Як саме заготовляли листя і кореневища об'єкту досліджень та якими були особливості їх зберігання?

З усього вищевикладеного можна зробити висновок про те, що дисертаційна робота «**Фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та отримання субстанцій різної біологічної дії**» є закінченою науковою працею, в якій досягнута основна мета та вирішені задачі дослідження, і відповідає вимогам пункту 10 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 6 березня 2019 року стосовно дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор **Яременко Максим Сергійович** – заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація».

Доцент кафедри фармакогнозії з
медичною ботанікою Тернопільського
національного медичного університету
ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України
к.біол.н., доцент

М. І. Шанайда

