

## ВІДГУК

офіційного опонента завідувача лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології Державної установи «Інститут мікробіології та імунології І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», доктора фармацевтичних наук, професора Мартинова Артура Вікторовича на дисертаційну роботу Леонтієва Богдана Станіславовича «Фармакогностичне вивчення плодів калини звичайної як перспективного джерела лікарської рослинної сировини», подану до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.605.079 Національного фармацевтичного університету МОЗ України, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

### Актуальність теми дисертації

Незважаючи на значне спрямування фармацевтичної промисловості на розвиток ринку синтетичних лікарських засобів, не втрачає актуальність застосування лікарських препаратів на основі природних сполук. Для розширення асортименту таких препаратів необхідне збільшення номенклатури корисної лікарської рослинної сировини, покращення її якості, удосконалення виробничих процесів та технології одержання лікарських засобів на її основі. Перспективність та попит у фармацевтичній промисловості на препарати природного походження з широким спектром застосування та м'якою дією при лікуванні найпоширеніших захворювань є причиною пошуку нових, багатих на біологічно активні речовини рослин, а також методів їх стандартизації.

Згідно наведених літературних джерел сировина калини звичайної володіє досить різноманітним хімічним складом, що зумовлює в свою чергу широкий спектр фармакологічної дії. Відомо про такі фармацевтичні ефекти: антимікробний, антиоксидантний, гіпотензивний, капіляррозміцнюючий, протизапальний, сечогінний та інші. Представники цього виду рослин здавна відомі у народі як незамінні помічники при багатьох захворюваннях. Помітний обсяг наукових досліджень, проведених закордонними фахівцями, присвячений вивченню хімічного складу цієї рослини та її фармакологічним

властивостям. Плоди калини звичайної можна вважати перспективним об'єктом для фітохімічних досліджень. Даний вид рослини не є офіційним в Україні.

Тому проведення комплексного фармакогностичного вивчення сировини плодів калини звичайної вітчизняної заготівлі з метою розробки методів стандартизації сировини та створення на її основі ефективних вітчизняних лікарських засобів є актуальним.

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України та є фрагментом комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

### **Наукова новизна отриманих результатів**

У дисертаційній роботі представлено результати наукового обґрунтування дослідження сировини плодів калини звичайної вітчизняної заготівлі. Калина звичайна достатньо розповсюджена на території України та широко культивується, тому цілком для створення на основі біологічно активних речовин сировини даного виду нових ефективних вітчизняних засобів рослинного походження.

Дисертантом вперше проведено системне фармакогностичне вивчення серій плодів калини звичайної вітчизняної заготівлі. За допомогою хроматографічних методів аналізу в сировині встановлено компонентний склад сполук, що переганялися з водяною парою, вільних та зв'язаних АА, вільних та загальних вуглеводів, ЖК, ряду груп фенольних сполук: гідроксикоричних кислот, флавоноїдів.

Визначено кількісний вміст суми поліфенолів, суми гідроксикоричних кислот, суми флавоноїдів в серіях плодів калини звичайної вітчизняної заготівлі.

Леонтієвим Б. С. проведено вивчення морфолого-анатомічної будови плодів калини звичайної з використанням світлової мікроскопії, що дозволило встановити макро- та мікроскопічні діагностичні риси досліджуваних видів сировини.

На основі результатів скринінгового вивчення антимікробної активності обрано перспективний густий екстракт з плодів калини звичайної, для якого розроблено спосіб одержання та визначено основні параметри контролю його якості. При вивченні біологічної активності густого екстракту доведено антиоксидантну та антимікробну активність.

Патентом України на корисну модель № 150940 «Спосіб одержання засобу з антимікробною та антиоксидантною активністю з плодів калини» підтверджено новизну наукових досліджень.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Леонтієвим Б. С. обґрунтовано оптимальні умови одержання густого екстракту з плодів калини звичайної, визначено його антимікробну і антиоксидантну активність.

На основі одержаних автором результатів було розроблено проект МКЯ «Калини звичайної плодів екстракт густий», а також були використані показники якості сировини при розробці розділів «Ідентифікація А» та «Ідентифікація В» монографії ДФУ 2.0 «Калини плоди».

Результати дослідження дисертаційної роботи Леонтієва Б. С. впроваджені в науково-дослідну роботу профільних кафедр закладів вищої освіти України.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації**

При проведенні розбору матеріалів дисертації Леонтієва Богдана Станіславовича помітно, що дослідження виконані на сучасному науковому рівні. Усі наукові положення, висновки та практичні рекомендації обґрунтовані та логічно витікають із одержаних результатів. При вирішенні завдань, поставлених у дисертації, дисертантом було використано сучасні фізико-хімічні, хімічні, технологічні та біологічні методи, які виконані на високому науковому рівні. Загальні висновки до дисертації викладені структуровано та послідовно, повністю відображають результати проведеної роботи, а їх достовірність не викликає сумнівів. Матеріал, наведений у дисертаційній роботі Леонтієва Б.С., є цілісним та перспективним для впровадження у практичну фармацію.

#### **Повнота викладення матеріалів дослідження**

За матеріалами дисертації опубліковано 25 робіт, у тому числі 4 статті у наукових фахових виданнях, з них 1 у періодичному науковому виданні Scopus, 1 стаття у нефармацевтичному закордонному виданні, 1 патент України на корисну модель, а також 19 тез доповідей.

Результати дисертаційної роботи оприлюднені на 19 науково-практичних конференціях різного рівня.

#### **Аналіз основного змісту роботи, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків**

Дисертаційна робота викладена на 194 сторінках машинописного тексту, має традиційну структуру і складається із анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Основний текст дисертації складає 150 машинописних сторінок. Робота проілюстрована 31 таблицею та 59 рисунками. Список використаних джерел містить 194 найменувань - 64 кирилицею та 130 латиницею.

Дисертаційна робота оформлена з дотриманням відповідних вимог.

Робота починається з *анотації* українською та англійською мовами, у яких стисло представлено результати проведених дисертаційних досліджень. Англійська анотація повністю відповідає анотації українською мовою.

У *вступі* дисертант проводить обґрунтування вибору теми, формулює мету і завдання дослідження, наводить об'єкти, предмети, методи дослідження, наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, інформацію про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації, її обсяг і структуру. Мета дисертаційної роботи сформульована чітко та теоретично обґрунтована. Завдання, які вирішуються для досягнення поставленої мети окреслені та зрозумілі.

*Перший розділ* представлений аналізом наукових джерел щодо ботанічної характеристики, хімічного складу. Застосування у медичній сфері та у продуктовому виробництві плодів калини звичайної. Доведено доцільність подальшого комплексного фармакогностичного дослідження обраної лікарської рослинної сировини та перспективність розробки нових лікарських рослинних засобів на їх основі.

У *другому розділі* наведено інформацію про об'єкти, прилади, методи, методики та реактиви, які використовували при проведенні досліджень.

При виконанні досліджень використано сучасні фізичні, фізико-хімічні, хімічні, технологічні, макро- та мікроскопічні, мікробіологічні, біологічні методи та методи математичної статистики.

У *третьому розділі* містяться результати морфолого-анатомічного вивчення стиглих плодів калини звичайної, визначення морфометричних показників та діагностичних ознак сировини. Автором висвітлені морфологічні та мікроскопічні ознаки плодів вітчизняних районів заготівлі.

Результати визначення показників якості використані при розробці розділів «Ідентифікація А» та «Ідентифікація В» монографії ДФУ 2.0 «Калини плоди».

У *четвертому розділі* представлені результати фітохімічного аналізу серій плодів калини звичайної. У досліджуваному виді сировини проведено

системне дослідження компонентного складу основних груп БАР. Визначено компонентний склад амінокислот (вільних та зв'язаних) та вуглеводів (вільних та загальних), полісахаридів, гідроксикоричних, жирних та суми органічних кислот, сполук, що переганяються з водяною парою, фенольних сполук, золи та мінеральних речовин.

Дисертантом, за допомогою метода ГХ/МС було встановлено компонентний амінокислотний склад оплодня та кісточки плодів калини звичайної. В якісному плані компонентний склад як вільних і зв'язаних, так і замінних і незамінних амінокислот індивідуальний для кожного об'єкта, що досліджували. Загалом ідентифіковано 16 амінокислот. Найбільший вміст встановлено для амінокислот проліну – понад 20 мкг/кг. Майже однаковий вміст фенілаланіну і лейцину в обох об'єктах - як у вільному, так і зв'язаному стані (відповідно,  $15,30 \pm 0,30$  мкг/кг- $15,38 \pm 0,32$  мкг/кг та  $15,96 \pm 0,31$  мкг/кг- $16,04 \pm 0,61$  мкг/кг). Вміст гліцину та треоніну є нижчим. Найбільший сумарний вміст вільних амінокислот визначено у кісточці - 173,12 мкг/кг, а найменший – також в кісточці у зв'язаному стані – 131,95 мкг/кг, тобто в 1,3 рази нижчий. Вміст загальної кількості вільних і зв'язаних амінокислот у оплодні становить 290,29 мкг/кг, у кісточці, відповідно, 304,07 мкг/кг.

Методом ВЕРХ встановлено комопнентний склад вільних та загальних вуглеводів оплодня та кісточки. Найрізноманітніший склад характерний для загальних вуглеводів кісточки – не менше 9 сполук. Найбідніший – для вільних вуглеводів кісточки плоду (не менше 4 сполук). Лише D- глюкозу знайдено у вільному і зв'язаному стані у кісточці та оплодні, вміст цієї сполуки коливається від  $12,44 \pm 0,30$  мг/г до  $12,74 \pm 0,38$  мг/г. Тільки кісточка містить значну кількість сахарози лише у вільному стані –  $32,83 \pm 0,64$  мг/г. D- Галактоза, D-ксилоза, D-маноза та L-рамноза у кісточці містяться лише у зв'язаному стані, в той час у оплодні у зв'язаному стані міститься лише L-рамноза.

Визначений кількісний вміст полісахаридів в 6 серіях плодів калини звичайної показав, що ця група БАР міститься не менше ніж 4,5 %.

Визначення компонентного складу жирних кислот у складових плоду калини звичайної проведено методом ГХ. У кісточці плоду калини звичайної знайдено 11 жирних кислот, з яких ідентифіковано 8. У оплодні із 15 знайдених жирних кислот ідентифіковано 14. Загальними для обох складових плодів є 8 жирних кислот (2 насичених та 6 ненасичених). У кісточці вміст суми ненасичених жирних кислот складає більше 97 % від загальної суми жирних кислот. У оплодні вміст ненасичених жирних кислот в 1,5 рази нижче у порівнянні з цим показником кісточки та складає більш 67 % від загальної суми жирних кислот. Домінуючою жирних кислот і в кісточці, і в оплодні плодів калини звичайної є мононенасичена олеїнова кислота.

Проведено визначення кількісного вмісту суми органічних кислот в перерахунку на яблучну кислоту в серіях плодів калини звичайної (за методикою монографії «Шипшини плоди» ДФУ 2.0) з валідацією методики. Кількісний вміст цієї групи БАР становив не нижче 6,8 %.

Визначений кількісний вміст аскорбінової кислоти (за методикою монографії «Шипшини плоди» ДФУ 2.0) в серіях плодів калини звичайної. Встановлено нижній рівень вмісту – не нижче 26 мг%.

За допомогою ГХ/МС визначено та проаналізовано компонентний склад сполук, що переганяються з водяною парою, плодів калини звичайної. Загалом ідентифіковано 26 сполук.

Ідентифіковано терпени каріофілен (відсоток співпадання – 98), (+)епі-біциклосесквифіландрен (відсоток співпадання – 93), а також алкан ейкозан (відсоток співпадання – 96).

Ідентифіковано високомолекулярні аліфатичні карбонові кислоти: тетрадеканову (мірістинову) кислоту (відсоток співпадання – 98), гексадеканову (пальмітинову) кислоту (відсоток співпадання – 98), лінолеву кислоту (відсоток співпадання – 96), 9,12-октадиєнову кислоту (Z,Z)- (відсоток співпадання – 99).

Методом ВЕРХ проводили вивчення компонентного складу гідроксикоричних кислот плодів калини звичайної. Загалом знайдено не

менше 5 сполук цієї групи. Домінує вміст хлорогенової кислоти ( $902,3 \pm 1,7$  мкг/г), нижчий в 10-20 разів вміст решти компонентів.

Встановлено кількісний вміст суми гідроксикоричних кислот в перерахунку на розмаринову кислоту (монографія ДФУ 2.0) в серіях плодів калини звичайної, що становив не нижче 3,9 %.

Встановлено компонентний склад флавоноїдів в плодах калини звичайної методом ВЕРХ. Нами знайдено не менш 3 сполук флавоноїдної природи, з яких один глікозид халкону да 2 глікозиди флавонолу кверцетину. Високий вміст визначено для біозиду рутину -  $2569,54 \pm 2,00$  мкг/г, значно нижчий (майже у 20 разів) вміст визначено для кверцетин-3-О- $\beta$ -глюкозиду (ізокверцитрину)  $135,99 \pm 0,03$  мкг/г. Вміст неогесперидину в порівнянні з рутином нижче майже удвічі та дорівнює  $1369,02 \pm 0,76$  мкг/г.

Проведено визначення кількісного вмісту антоціанів в серіях плодів калини звичайної (монографія «Чорниці плоди свіжі» ДФУ 2.0) з встановленням нижньої межі, що дорівнює 0,17 %.

Проведено визначення кількісного вмісту проціанідинів в серіях плодів калини звичайної (монографія «Глоду плоди» ДФУ 2.0) з встановленням нижньої межі, що дорівнює 0,23 %.

Проведено визначення кількісного вмісту флавоноїдів в серіях плодів калини звичайної (монографія «Сафлору квітки» ДФУ 2.0) з встановленням нижньої межі, що дорівнює 1,9 %.

Визначено кількісний вміст суми поліфенолів та танінів у перерахунку на пірогалол (ДФУ 2.0) у 6 серіях плодів калини звичайної. Нижні межі вмісту кожної з цих груп БАР дорівнюють, відповідно, 1,7 % та 0,7 %.

Визначено елементний склад 6 серій плодів калини звичайної. Для накопичення макроелементів у сировині спостерігається наступна закономірність: для всіх досліджуваних серій сировини за вмістом домінували калій та кальцій ( $K > Ca$ ). Для решти макроелементів спостерігається значна варіабельність даних. Так, для плодів серій 1 та 5 визначено наступний варіант –  $P > Mg > Na > Si$ , серії 2 –  $Mg > Na > P, Si$ , серії 3 –  $Mg > Na, P > Si$ , серії 4 –



Mg>P>Si>Na, серії 6 - Na>Mg>P>Si. Вміст важких металів знаходився в межах гранично допустимих норм для ЛРС згідно з вимогами ДФУ 2.0.

Дисертантом зроблено висновок, що одержані результати системного фармакогностичного дослідження сировини серій плодів калини звичайної вітчизняної заготівлі стали у нагоді при розробці відповідних розділів монографії ДФУ 2.0 на сировину.

*П'ятий розділ* містить інформацію про визначення технологічних параметрів ; встановлення оптимальних параметрів технологічного процесу та розробка технології одержання густого екстракту з плодів калини звичайної; визначення основних показників плодів калини звичайної та густого екстракту з досліджуваної сировини; дослідження ряду аспектів біологічної активності субстанцій з сировини.

Дисертантом були визначені технологічні параметри для сировини плодів калини звичайної такі як: втрата в масі при висушуванні, середній розмір часток, питома, об'ємна, насипна маси, пористість сировини, порізність шару, вільний об'єм шару, питома поверхня часток, плинність, коефіцієнти поглинання води та 90% етанолу. Це дозволило визначити оптимальні параметри технологічного процесу та розробити технологію отримання густого екстракту з плодів калини звичайної. Також було доведено антимікробну та антиоксидантну дію густого екстракту з плодів калини звичайної.

Слід зазначити, що експериментальна частина дисертаційної роботи виконана на високому науковому рівні, має практичне значення а теоретичне обґрунтування. Висновки роботи обґрунтовані та відповідають поставленим завданням.

Поряд з позитивними характеристиками роботи необхідно відмітити деякі *зауваження та пропозиції*:

При аналізі дисертаційної роботи виникли деякі *зауваження та пропозиції*.

- На мою думку не бажано було б наводити фотографії всіх існуючих на ринку дієтичних добавок із калиною.
- Ви у вступі перелічили багато сортів калини. Ви якось фіксували які сорти калини ви заготовлювали? Бажано було б фіксувати не тільки вид, а й сорти і місце заготівлі з датою.
- Бажано було б у підписах до хроматограм навести умови хроматографування, як це прийнято в міжнародних публікаціях, в т.ч. тезах дисертацій.
- На рис. 4.16 важко розрізнити назви речовин, бажано було б збільшити розмір шрифту на рисунку, якщо це було можливо.
- У розділі 3, для створення більш системного підходу у проведенні морфолого-анатомічних досліджень, бажано було б додати результати дослідження анатомічної будови нестиглих плодів калини звичайної.
- У дисертаційній роботі присутній ряд технічних помилок.

Ці зауваження та пропозиції не знижують системність викладення результатів, їх обговорення та формулювання висновків. Наведені зауваження та пропозиції не впливають на загальну оцінку роботи та мають на меті лише рекомендаційний характер.

Для проведення **наукової дискусії** вважаю за доцільне висунути такі запитання.

1. Чи входять монографії на сировину калини звичайної у фармакопеї інших країн світу?
2. Чи є на світовому фармацевтичному ринку лікарські препарати з плодів калини, що вивчалися? Можливо, є лікарські препарати з інших видів сировини цього виду рослини?
3. Чому для визначення кількісного вмісту суми гідроксикоричних кислот та суми флавоноїдів обрано методики цих монографії ДФУ 2.0?

### **Висновок**

Таким чином, дисертаційна робота «Фармакогностичне вивчення плодів калини звичайної як перспективного джерела лікарської рослинної сировини» повністю відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою КМУ від 12 січня 2022 року № 44, а її автор, Леонтієв Богдан Станіславович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

### **Офіційний опонент**

Завідувач лабораторії та клінічного відділу  
молекулярної імунофармакології  
Державної установи «Інститут  
мікробіології та імунології  
І. І. Мечникова Національної  
академії медичних наук України»,  
доктор фармацевтичних  
наук, професор

Артур МАРТИНОВ

