

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Хропот Оксани Сергіївни на тему **“Використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*”**, представлена до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду ДФ 35.052.069 в Національному університеті «Львівська політехніка» на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація

Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з державними і галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки та техніки.

Біотехнологія вивчає методи одержання корисних для людини продуктів в керованих умовах, використовуючи мікроорганізми, клітини. Цей термін появився приблизно 30 років тому. Сьогодні біотехнологічні методи широко застосовують в самих найважливіших галузях медицини (діагностика, лікування патології важких хвороб), в фармацевтичній промисловості, харчовій і переробній промисловості.

Метод культури клітин, тканин і органів використовують в даний час в усьому світі при вирішуванні багатьох проблем сучасної біології. В основу методу культури тканин покладено пізнання живої клітини і законів, які управляють процесами життєдіяльності.

Метод культури тканин полягає у вирощуванні *in vitro* ізольованої клітини, її окремих структур, різних тканин, частин і органів рослин в стерильних умовах на твердому або рідкому поживному середовищі. Одним із основних принципів розробки культури тканин є ступінь відтворення *in vitro* умов близьких або ідентичних тим, в яких клітини перебувають на материнській рослині. Чим більш повною мірою в культурі *in vitro* відтворюються природні умови для того чи іншого типу клітин, тим більшого успіху досягають при їх вирощуванні.

Калусною тканиною вищої рослини називають тканину, яка виникла шляхом неорганізованої проліферації із експлантів органів рослин після першого субкультивування. Крім того, калус утворюється в місцях пошкодження рослин.

Культури клітин рослин *in vitro* продукують вторинні метаболіти в досить високих концентраціях, хоча іноді в рослинах клітин вони присутні в дуже малих кількостях.

Завдяки зусиллям багатьох вчених накопичено немало цінної інформації

про здатність калусних тканин синтезувати і інші біологічно активні речовини. Клітини рослин, що культивуються зберігають присутню вихідному виду рослин здатність синтезувати широкий спектр речовин вторинного метаболізму: алкалоїди, терпеноїди, глікозиди, поліфеноли, поліцукри, ефірні олії, незвичні пептиди та спеціалізовані білки, натуральні барвники, стероїди, пряності, інсектициди, воски, вітаміни. Якщо традиційні біотехнології для отримання цінних біологічно активних речовин використовували цілі організми: мікроорганізми, рослини, тварини, то сучасна біотехнологія націлена на клітинні технології, які ґрунтуються на культивуванні вільних та іммобілізованих клітин.

Викликає інтерес сучасний стан використання в медицині і фармації представників родини Жовтецеві (*Ranunculaceae*). Це - однорічні, дворічні, багаторічні трави, рідше кущі, напівкущі, ліани. Серед них є наземні й водні рослини. Це велика родина, що охоплює понад 66 родів і близько 2 000 видів, поширених головним чином у помірних і холодних областях, в Україні - 25 родів, біля 140 видів. У складі родини є чимало отруйних і небезпечних для тварин та людини рослин, які містять різні алкалоїди, глікозиди тощо. Рослини відомі як лікарські, й декоративні. Деякі види родини Жовтецеві є рідкісними та зникаючими, які потребують охорони та заходів щодо їх збереження.

Перспективними для дослідження є анемона дібровна (*Anemone nemorosa* L.), дельфіній високий (*Delphinium elatum* L.), сон білий (*Pulsatilla alba* Reichenb.)

Тому пошук і розробка нових шляхів одержання та використання рослин родини *Ranunculaceae* – *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. – для отримання БАР в системі *in vitro* є актуальним.

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт «Біотехнологічні та фітохімічні аспекти дослідження процесу одержання біологічно активних сполук з лікарських рослин» (№0119U101965), «Створення нових лікарських засобів фіто- та біопрепаратів» (№0119U101957), «Розробка та вдосконалення технологій одержання рослинних екстрактів та фітопрепаратів» (№0119U102132).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі. Достовірність та обґрунтованість викладених наукових положень не викликає сумніву. У роботі використані сучасні методи аналізу, які широко використовують у фармацевтичному аналізі та при контролі якості лікарських засобів.

Матеріали дисертації викладено послідовно, сформульовані загальні

висновки та висновки за розділами дисертації логічно витікають із розділів дисертації, викладені змістовно та лаконічно. Поставлені завдання дисертаційної роботи для досягнення мети виконані повною мірою.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено біотехнологічні способи одержання БАР в системі *in vitro*.

Було введено в культуру *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.; досліджено параметри росту експлантів та калюсних культур, підібрано стерилізуючі агенти для експлантів та оптимізовано склад живильного середовища; одержано КБ та проведено її стандартизацію.

Проведено фітохімічне вивчення БАР калюсних біомас (КБ) та рослинної сировини досліджуваних рослин родини *Ranunculaceae* – присутні флавоноїди, дубильні речовини, гідроксикоричні кислоти, гідрохінонпохідні, алкалоїди, антоціани, ліпофільні речовини, сполуки стероїдної структури.

Досліджено гостру токсичність та фармакологічну дію екстрактів з КБ та рослинної сировини *A. nemorosa*, *D. elatum*, *P. alba*. На основі проведених фітохімічних, фармакологічних, біотехнологічних досліджень доведено можливість та доцільність використання КБ досліджуваних видів рослин як рівноцінної лікарської сировини.

Теоретичне і практичне значення одержаних результатів. Автором розроблено методики культивування в умовах *in vitro* *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. Оптимізовано склад живильного середовища та підібрано оптимальні умови для одержання КБ. Доведено можливість та доцільність використання КБ досліджуваних видів рослин як рівноцінної лікарської сировини, які ґрунтуються на результатах фітохімічних, фармакологічних та біотехнологічних досліджень.

Розроблено проекти МКЯ екстрактів та КБ *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.

Практичні результати впроваджено в практичну роботу на ТзОВ «Технолаб» та у навчальний процес та науково-дослідну роботу ряду профільних кафедр ЗВО України.

Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 7 статей (із них 3 – у наукових фахових виданнях України та 2 в іноземному виданні, що входить до наукометричних баз), 13 тез доповідей. Публікації повною мірою відображають результати дисертаційного дослідження.

Зміст та оформлення дисертації, завершеність дисертації в цілому.

Дисертаційна робота викладена на 237 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, розділу що містить відомості про об'єкти, прилади, матеріали, методи і реактиви, 4 розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 39 таблицями та 37 рисунками. Список використаних джерел містить 201 найменування, з них 109 кирилицею та 92 латиницею.

Робота Хропот О.С. добре ілюстрована, що полегшує сприйняття викладеного матеріалу.

У роботі відсутні порушення академічної доброчесності.

Перший розділ дисертації «*Рослини родини Ranunculaceae – перспективні об'єкти фармакогностичних та біотехнологічних досліджень (літературний огляд)*» висвітлює дані першоджерел щодо ботанічної характеристики, ареалів розповсюдження, сучасного стану вивчення хімічного складу, застосування в науковій та народній медицині рослин родини *Ranunculaceae* Juss. (*Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.), культивування видів родини Жовтецеві в умовах *in vitro*. В цьому розділі автор робить висновок, що рослини родини *Ranunculaceae* Juss., зокрема *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb., є перспективними для виробництва фітопрепаратів. Ці види лікарських рослин є рідкісними, запаси рослинної сировини є обмежені, ЛЗ на основі сировини

A. nemorosa L., *D. elatum* L. та *P. alba* Reichenb. на українському ринку відсутні. Актуальним є їх культивування в умовах *in vitro*, що дозволить регулювати процес накопичення калусної біомаси, оптимізувати умови вирощування з метою збільшення кількості цільового продукту, а також стандартизувати склад як лікарської сировини, так і готових фітопрепаратів.

Другий розділ «*Об'єкти, методи та методика досліджень*» містить інформацію про загальну методологію досліджень, об'єкти дослідження, відомості про прилади, матеріали, методики та реактиви, які використовувались при проведенні досліджень. Дисертантом сформульовано загальну стратегічну лінію роботи з культивування рослин родини *Ranunculaceae* в системі *in vitro* для отримання комплексу біологічно активних речовин, побудовано програмно-цільову структуру, визначено основні етапи роботи.

Третій розділ «*Одержання калусної біомаси лікарських рослин родини Ranunculaceae: Anemone nemorose L., Delphinium elatum L., Pulsatilla alba Reichenb.*» присвячено одержанню калусної біомаси досліджуваних видів.

Дисертантом введено в культуру в умовах *in vitro* рослини родини *Ranunculaceae*: *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L. та *Pulsatilla alba* Reichenb. Підібрано стерилізуючі агенти для максимального отримання життєздатних експлантів, вивчено вплив регуляторів росту на ріст калюсної біомаси, встановлено умови культивування для кожної рослини з найвищим виходом калюсної біомаси. Для кожної рослини підібрано схему стратифікації та стерилізації. Також підібрано регулятори росту та їх концентрацію, отримано калюсні біомаси з корневих, листкових, стеблових, черешкових експлантів.

У четвертому розділі «**Екстракція рослинної сировини і калюсних біомас досліджуваних лікарських рослин**» представлено результати підбору умов екстракції рослинної сировини *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb. та їх калюсних біомас (розмір частин у фракціях, екстрагент, співвідношення між сировиною і екстрагентом, час екстракції), стандартизації екстрактів з рослинної сировини.

Експериментальним шляхом виявлений оптимальний розчинник для одержання екстрактів – 50 % або 70 % етанол.

У п'ятому розділі «**Фітохімічний аналіз рослинної сировини, калюсних біомас та екстрактів *Anemone nemorosa* L., *Delphinium elatum* L., *Pulsatilla alba* Reichenb.**» наведено результати ідентифікації фенольних сполук у екстрактах з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L. і *P. alba* Reichenb., ідентифікації та кількісного визначення БАР методом ВЕРХ, кількісного визначення суми фенольних сполук, флавоноїдів, дубильних речовин, суми гідроксикоричних сполук, гідрохінонпохідних, антоціанів. Проведено порівняльний аналіз компонентного складу легкої фракції екстрактів з ЛРС та КБ *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* методом хромато-мас-спектрометрії. Дисертант стверджує, що 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. Визначено дисертантом речовини у складі легких фракцій КБ та ЛРС *A. nemorosa* L., *D. elatum* L., *P. alba* Reichenb., які відрізняються за компонентним складом.

У шостому розділі «**Біологічна активність і фармакологічна дія екстрактів**» представлено результати дослідження гострої токсичності, гепатопротекторної, гіпоазотемічної, протизапальної, антиоксидантної, антитромботичної, протимікробної та протигрибкової активності досліджуваних екстрактів. Встановлено, що екстракти належать до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини). На підставі вивчення

гепатопротекторної дії екстрактів ЛРС і КБ *Anemone nemosa*, *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* в експериментах *in vivo* на моделі тетрахлорметанового гострого токсичного гепатозу не проявляють або проявляють помірну гепатопротекторну активність. Всі екстракти проявляють діуретичну дію та мають позитивний вплив на виведення з організму білих щурів азотистих метаболітів сечовини та креатиніну. Задовільний рівень антиексудативного ефекту проявили екстракти КБ та ЛРС *Delphinium elatum* та *Pulsatilla alba*. Дисертантом встановлено, що кращу протигрибкову дію проявили 70 % екстракти ЛРС та КБ *Pulsatilla alba* та *Delphinium elatum*. Для референтних і клінічних штамів зафіксовано рівнозначну ефективність екстрактів КБ вищевказаних рослин та екстрактів ЛРС. Досліджувані екстракти ЛРС і КБ *Delphinium elatum*, *Pulsatilla alba* та *Anemone nemosa* мають протимікробні та протигрибкові властивості в однаковій мірі.

Зауваження і пропозиції.

Результати роботи вірогідні, висновки зроблені на їх основі не викликають заперечень. Проте виникають питання та є ряд зауважень:

1. Робота написана грамотно, легко читається, але іноді зустрічаються технічні помилки, невдалі або не точні вислови.

2. При оформленні рис. 1.1 – 1.3, 1.7, 1.8, 1.12 доцільно подати посилання на літературне джерело.

3. В розділі 5.3 наведено результати кількісного визначення біологічно активних речовин в досліджуваних об'єктах. ЛРС і КБ різних рослин суттєво відрізняються за вмістом всіх груп за виключенням суми антоціанів. Доцільним є обґрунтування результатів дослідження, що дозволило б запропонувати методи стандартизації для конкретного виду сировини.

4. За класифікацією К.К. Сидорова при внутрішньошлунковому введенні доза 500-5000 мг/кг відповідає IV класу токсичності – малотоксичні сполуки (Стефанов О.В., 2001). Тому лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності є максимальна доза четвертого класу токсичності. Якщо при цьому не спостерігається загибелі тварин, введення більшої дози, як правило, є недоцільним. Виникає питання щодо доцільності проведення дослідження в дозах 10000 та 15000 мг/кг маси тіла тварини.

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

1. Україна бере активну участь у міжнародному співробітництві з охорони біологічного різноманіття. Яким на сьогодні є статут об'єктів дослідження (анемони дібрової, дельфінію високого і соню білого)? Чи

проведене Вами дослідження дозволить запропонувати ЛЗ з достатньою сировинною базою?

2. В розділі 3 наведено результати одержання калусної біомаси лікарських рослин родини *Ranunculaceae*. Підібрано оптимальне середовище для культивування, його тривалість (40 – 50 діб), температурний режим тощо. Якою є вартість калусної біомаси, наскільки економічно вигідно використовувати її як джерело БАР?

3. В таблиці 4.6 наведено результати вибору екстрагенту при виділенні БАР з рослин – сону білого, дельфінію високого, анемони дібрової. Критеріями були вміст екстрактивних речовин і сума поліфенолів. Які групи БАР, на Вашу думку, буде екстрагувати 20 %, 40 % і 90 % етанол? Чим зумовлений вибір 70 % етанолу як оптимального екстрагенту?

4. В зразках сировини виявлено алкалоїди (табл. 5.1), в т.ч. в дельфінію високому. В іншому виді – дельфінію сітчатоплідному – вміст алкалоїдів становить 0,34 – 1,23 %; переважає метиллікаконітин, який проявляє курареподібні властивості. Яким є вміст алкалоїдів в досліджуваних об'єктах і які застережні заходи Ви використовували при роботі з КБ і ЛРС?

Дослідження Хропот О.С. виконані на сучасному науковому рівні, що свідчить про високий рівень знань, теоретичної та практичної підготовки дисертанта. Розділи дисертації включають теоретичний і практичний аспект дослідження, кожен розділ та підрозділ присвячується певній задачі, поставленій дослідженням. Новизна, достовірність наукових теоретичних і практичних результатів не викликає сумнівів. Наведені дискусійні моменти та зауваження не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження у практиці. Теоретичні та практичні результати дисертації можуть бути використані при розробці нормативної документації на нову лікарську рослинну сировину та при створенні нових лікарських засобів з протигрибковою та антимікробною, антитромботичною, гіпоазотемічною активністю. Також отримані результати доцільно використовувати у навчальному процесі та науковій роботі профільних закладів вищої освіти України.

Висновок. Зазначені зауваження не знижують загальної позитивної оцінки рецензованої роботи, тому слід зробити висновок, що за всіма зазначеними параметрами дисертаційна робота *Хропот Оксани Сергіївни* на тему “Використання рослин родини *Ranunculaceae* для отримання біологічно активних речовин в системі *in vitro*” є завершеною науковою працею, за актуальністю обраної теми, науковою новизною, практичною значимістю,

обсягом виконаних досліджень, достовірністю отриманих результатів, повнотою публікацій повною мірою відповідає вимогам п. 10 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою КМУ № 167 від 6 березня 2019 року(зі змінами, затвердженими постановою КМУ «979 від 21 жовтня 2020 р.), а її автор, **Хропот Оксана Сергіївна**, заслуговує на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація.

Завідувач кафедри фармації

Івано-Франківського національного

медичного університету

доктор фармацевтичних наук, професор



Грицик А.Р.

Я **Грицик А.Р.** **ЗАСВІДЧУЮ**
підписав цього кандидата (начальник відділу кадрів)
Івано-Франківського національного медичного університету
» _____ 20__ р.

Підпис: *Грицик А.Р.*
Прізвище: *Грицик А.Р.*