

## **ОТЗЫВ**

на диссертацию Адамцевич Натальи Юрьевны  
«Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейник  
лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) как источники флавоноидов,  
обладающих ранозаживляющим действием», представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 –  
физиология и биохимия растений

### **Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите.**

Диссертационная работа Адамцевич Натальи Юрьевны посвящена исследованию особенностей накопления фармакологически ценных фитометаболитов флавоноидной природы в растениях бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.), а также разработке способов применения экстрактов на их основе в качестве ранозаживляющих средств. По цели и задачам исследования, методологии, объекту и предмету исследования, полученным результатам и положениям, вынесенным на защиту, диссертационная работа соответствует отрасли – «биологические науки», специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» по следующим пунктам паспорта специальности:

п. 1. Структура и функции растительной клетки, формирование и функционирование ее структурных элементов, органелл, цитоскелета и клеточной стенки. Органы, ткани, функциональные системы растений. Химический состав, строение и свойства веществ живой природы; исследования свойств, выделение и способы использования соединений, относящихся к различным классам и группам;

п. 18. Вторичный метаболизм. Процессы биосинтеза и физиологические функции вторичных метаболитов.

п. 20. Разработка физиологических и биохимических методов исследования.

### **Актуальность темы диссертации.**

Растительные объекты представляют собой неисчерпаемый ресурс фитометаболитов различной природы с широчайшим спектром биологических активностей. Флавоноиды представляют собой важнейшую группу растительных полифенолов, проявляющих фотопротекторную, противовирусную, противоаллергическую, противовоспалительную, противоопухолевую, антиоксидантную и другие типы активностей. Среди широкого спектра биологических активностей флавоноидов, одной из актуальной является их способность оказывать влияние на воспалительный процесс, ангиогенез, реепителизацию и окислительный стресс при лечении трудно заживающих ран. В связи с этим растительное сырье, содержащее

фармакологически ценные флавоноиды, является важным и перспективным источником для создания новых эффективных и безопасных фитопрепаратов.

Однако, как известно, состав и содержание индивидуальных вторичных метаболитов существенно варьирует в растительном сырье в зависимости от тканей и органов, в которых они синтезируются и накапливаются, вида растения, агроклиматической зоны произрастания и других факторов.

В этой связи, исследования в области фитохимического анализа, биологической активности фармакологически ценных соединений флавоноидной природы и разработка новых фитопрепаратов на их основе представляется весьма актуальным направлением в современной физиологии и биохимии растений.

В диссертационной работе Адамцевич Н.Ю. сделана попытка создания комплексного фитопрепарата с ранозаживляющим эффектом на основе экстрактов растений бессмертника песчаного и воробейника лекарственного. С этой целью в работе был проведен широкий скрининг компонентов флавоноидного комплекса в надземных органах исследуемых растений, выявлена орган-специфическая локализация фармакологически ценных 3-О-гликозида кемпферола и изокверцитрина в изучаемых объектах, установлено влияние условий и способов экстрагирования на максимально эффективный выход анализируемых фитометаболитов, произведена оценка антимикробной активности экстрактов исследуемых видов растений.

Таким образом, диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. «Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) как источники флавоноидов, обладающих ранозаживляющим действием» представляется актуальной. С одной стороны, она расширяет представления об особенностях накопления высоко ценных фармакологически активных фитометаболитов флавоноидной природы 3-О-гликозида кемпферола и изокверцитрина в лекарственном сырье, с другой – позволяет выработать подходы для создания новых эффективных средств ранозаживляющего действия на основе сырья бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, произрастающих в Республике Беларусь.

### **Степень новизны результатов и научных положений, выносимых на защиту.**

В ходе выполнения диссертационной работы Адамцевич Натальей Юрьевной получен ряд научных результатов, обладающих несомненной новизной.

Автором впервые установлены особенности орган-специфической локализации метаболитов флавоноидной природы в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, культивируемых в центральной агроклиматической зоне Беларуси. Это позволило выявить преобладающее накопление кемпферол-3-О-гликозида в генеративных органах в период бутонизации у бессмертника песчаного и изокверцитрина в листьях в период

цветения у воробейника лекарственного. Данные результаты отражены в первом положении, выносимом на защиту.

Автором получен ряд новых данных по выявлению наиболее эффективного способа экстрагирования флавоноидов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного. В частности, установлено, что оптимальные значения мощности микроволнового излучения с частотой 2450 МГц при экстрагировании флавоноидов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, обеспечивающие более чем 10-кратное сокращение продолжительности извлечения экстрактивных веществ из растительной ткани и увеличение на 30 % выхода изокверцитрина у воробейника лекарственного, не должны превышать 300 Вт, что отражено во втором положении, выносимом на защиту.

К наиболее значимым результатам по научной новизне следует отнести исследование антимикробной активности и ранозаживляющей способности водно-этанольных экстрактов из сырья бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, культивируемых в центральной агроклиматической зоне Беларуси, и разработку на их основе комплексного фитопрепарата. В частности автором выявлено, что высушенный водно-этанольный экстракт из генеративных органов бессмертника песчаного, содержащий кемферол-3-О-глюкозид, обладает антимикробной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* и после очищения от балластных веществ может быть рекомендован для использования в качестве антибактериального средства при его массовом содержании более 1,1%. Впервые установлено что, введение сухих экстрактов из генеративных органов бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в массовом соотношении 1 : 1, содержащих, соответственно, кемферол-3-О-глюкозид и изокверцитрин, в гелевую форму в количестве 2-4 % способствует проявлению выраженного ранозаживляющего действия. Данные результаты являются новыми и существенно дополняют имеющиеся представления о биохимических методах выделения и способах использования фармакологически ценных вторичных метаболитов флавоноидной природы, они отражены в третьем и четвертом положениях, выносимых на защиту.

Новизна результатов исследований Адамцевич Н.Ю. подтверждена решением Национального центра интеллектуальной собственности Республики Беларусь о выдаче двух патентов на изобретение № 23779 С1 и № 23846 С1.

### **Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Адамцевич Н.Ю. выполнила значительный объем экспериментальной работы с использованием как классических, так и современных методов исследования (микроскопические, спектрофотометрические, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией и др.). Опыты проводились в трехкратной повторности.

В работе проведена статистическая обработка экспериментальных данных и оценка значимости различий между ними.

Таким образом, результаты, представленные в диссертационной работе, являются статистически достоверными, выводы и рекомендации основаны на полученных экспериментальных данных и являются вполне обоснованными.

### **Научная, практическая и экономическая значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.**

Результаты, представленные в диссертационной работе, имеют как научную, так и практическую значимость. Научная значимость полученных в работе результатов состоит в развитии и существенном расширении представлений об особенностях накопления высоко ценных фармакологически активных фитометаболитов флавоноидной природы 3-О-гликозида кемпферола и изокверцитрина в лекарственном сырье растений бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.), культивируемых в центральной агроклиматической зоне Беларуси. Адамцевич Н.Ю. установлено, что преобладающее количество кемпферол-3-О-гликозида у бессмертника песчаного характерно для генеративных органов в период бутонизации, а максимальное содержание изокверцитрина у воробейника лекарственного выявлено в листьях в период цветения. Показано, что суммарное содержание флавоноидов в абсолютно сухой массе генеративных органов бессмертника песчаного может превышать 6 %, а целевого компонента – кемпферол-3-О-гликозида – 4 мг/г а.с.с., а в листьях воробейника лекарственного величина данного показателя в абсолютно сухой массе сырьевых частей достигает более 2 %, а целевого компонента – изокверцитрина – 3,5-4,0 мг/г а.с.с.

Важный практический интерес представляют результаты, которые отражают выявление оптимальных способов экстрагирования флавоноидов из сырья бессмертника песчаного и воробейника лекарственного. Установлено, что экстрагирование данных метаболитов из генеративных органов бессмертника песчаного оптимально проводить в режиме трехкратной экстракции с последовательным увеличением концентрации этилового спирта (40 → 70 → 96 %); в то время как извлечение флавоноидов из листьев воробейника лекарственного оптимально проводить в режиме однократной экстракции при использовании 50 %-ного этилового спирта. Выявлено, что наибольший выход исследуемых фитометаболитов достигается при мощности СВЧ-энергии 100-300 Вт, при этом выход изокверцитрина повышается на 30 %.

Высокую практическую значимость имеют результаты, связанные с разработкой и валидацией методики определения общего содержания флавоноидов в экстракте из листьев воробейника лекарственного методом дифференциальной спектрометрии по реакции образования окрашенного комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. Показано, что реакцию комплексообразования целесообразно проводить в течение 40 мин, при этом

отношение объема экстракта к объему раствора хлорида алюминия должно составлять 1 : 2.

Несомненную практическую ценность представляют результаты работы, которые связаны созданием комплексного биологически активного фитопрепарата в форме геля ранозаживляющего действия на основе высушенных экстрактов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, проявляющего выраженные антимикробные и репаративные свойства. Данная разработка имеет важную практическую значимость, также и потому, что может служить теоретической основой для создания новых регенерирующих препаратов, используемых в медицинской практике при лечении хронических ран, а также расширить современные методы воздействия на раневой процесс. Поэтому результаты работы, связанные с разработкой фитопрепарата могут быть использованы и внедрены отечественными фармацевтическими предприятиями.

Практическая значимость представленных в диссертации результатов также состоит в формировании новых знаний, которые расширяют существующие представления об особенностях накопления ценных вторичных метаболитов флавоноидной природы в лекарственном сырье, а также способах их выделения и идентификации. Полученные знания могут быть использованы при чтении курсов лекций по фармакогнозии, биохимии и физиологии растений в ВУЗах Республики Беларусь.

Экономическая значимость результатов может быть связана с решением проблемы импортозамещения при создании новых лекарственных ранозаживляющих и антибактериальных средств наружного применения отечественного производства на основе высушенных экстрактов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, культивируемых в Республике Беларусь.

По результатам исследований имеется 3 акта внедрения в образовательный процесс Белорусского государственного технологического университета на кафедре биотехнологии (Акты внедрения от 14.05.2019 г., от 04.09.2019 г., от 02.10.2017 г., от 01128.2020 г., приложение А), а также два патента на изобретение № 23779 С1 и № 23846 С1.

#### **Опубликованность результатов диссертации в научной печати.**

Материалы диссертации опубликованы в 22 научных работах, среди них 7 статей в рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК Беларуси и зарубежных научных изданиях, 10 статей в сборниках материалов конференций и 2 тезисов докладов. Общий объем материалов диссертационного исследования, опубликованных в изданиях из Перечня ВАК, составляет 4,9 авторских листа, других публикаций – 2,5 авторских листа.

#### **Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.**

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Беларуси, изложена на 150 страницах печатного текста, содержит 50 рисунков, 35 таблиц и 5 приложений. Работа имеет все необходимые разделы и состоит

из перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), изложения полученных результатов и их обсуждения (главы 3–5), заключения, библиографического списка, включающего 308 источника литературы (из них 196 – зарубежные), списка публикаций соискателя и приложений.

В обзоре литературы автор приводит современные данные о структуре, классификации, свойствах, биосинтезе и функциях флавоноидов в растениях. Кроме того, в данной главе подробно рассматриваются и анализируются литературные данные о биологической активности флавоноидов. Особое внимание уделено методам экстрагирования флавоноидов из растительного сырья и их качественному и количественному анализу. Из литературного анализа логично вытекают поставленные научные задачи.

Во второй главе достаточно полно описаны методы исследования, которые позволяют заключить, что диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. выполнена на высоком методическом уровне с использованием классических и современных методов исследования.

Экспериментальные главы 3–5 включают обоснование поставленной задачи, представление полученных результатов, их подробный и конструктивный анализ, а также заключения.

В целом диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. написана грамотно и логично, хорошим научным языком. Материал диссертации легко воспринимается и сопровождается рисунками и таблицами. Результаты изложены в логической последовательности, положения и выводы вытекают из поставленных задач и основаны на полученных экспериментальных данных.

Автореферат диссертации отражает суть работы, ее результаты и основные положения, выносимые на защиту.

В ходе изучения диссертационной работы Адамцевич Н.Ю. возникли следующие замечания:

1. В раздел 1.1 «Ботаническое описание лекарственных растений» включены данные по биохимическому описанию и биологической активности исследуемых растений, что формально не относится к «ботаническому описанию». Следовало разделить данные характеристики на подразделы.
2. При описании хроматографических методов анализа отсутствует информация об использовании стандартных образцов индивидуальных соединений и не указано как проводилась пробоподготовка экстрактов.
3. Результаты, полученные с использованием метода ТСХ (с. 88 и 97), практически не описаны и представлены без обозначений разделяемых индивидуальных компонентов, что следовало бы сделать для улучшения восприятия результатов. Не понятно почему при проведении ТСХ не использовались стандартные образцы.

4. В разделе «Статистическая обработка данных» не указаны значения биологических и аналитических повторностей проведения опытов.

5. При описании и обсуждении результатов исследований, описывающих накопление флавоноидов в изучаемых растениях (разделы 3.1 и 3.2), следовало бы привести данные других исследователей, чтобы провести сравнительный анализ и оценить биосинтетический потенциал объектов исследования в сравнении с растениями тех же таксонов, но произрастающих в других ареалах.

6. При оценке ранозаживляющей активности разработанного геля, было бы желательно в качестве дополнительного контроля иметь группу подопытных животных, которым на раневую поверхность наносился гель не содержащий растительные экстракты.

7. В работе имеется незначительное количество опечаток, например, стр. 25 – «фенилалан» (следует «фенилаланин»), стр. 69 «изокверцитри» (следует «изокверцитрин»).

Указанные замечания не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту, и не уменьшают общей высокой оценки работы.

**Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.**

Диссертация Адамцевич Натальи Юрьевны «Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) как источники флавоноидов, обладающих ранозаживляющим действием» является квалификационной научной работой и по актуальности, объему выполненной работы и значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям ВАК Беларусь, предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

В соответствии с требованиями «Положения ВАК о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» п. 20, Адамцевич Наталье Юрьевне может быть присуждена ученая степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» за новые научно обоснованные экспериментальные результаты исследования особенностей накопления метаболитов флавоноидной природы в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, культивируемых в центральной агроклиматической зоне Беларусь, и создании на их основе фитопрепарата ранозаживляющего действия, а именно:

- установление особенностей орган-специфической локализации метаболитов флавоноидной природы – кемпферол-3-О-глюкозида и изокверцитрина в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного;

- выявление закономерностей сезонной динамики накопления флавоноидов в надземных органах бессмертника песчаного и воробейника лекарственного;
- установление оптимальных способов экстрагирования флавоноидов из сырья бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, в частности, определение оптимальных значений мощности микроволнового излучения;
- доказательство антимикробной активности очищенного от балластных веществ экстракта из соцветий бессмертника песчаного в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*;
- разработку нового комплексного биологически активного фитопрепарата в форме геля ранозаживляющего действия на основе высушенных экстрактов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, проявляющего выраженные антимикробные и репаративные свойства.

Выражаю свое согласие на размещение отзыва о диссертации на официальном сайте государственного научного учреждения «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларусь» в глобальной компьютерной сети Интернет.

Официальный оппонент,  
доцент кафедры клеточной биологии  
и биоинженерии растений  
Белорусского государственного университета,  
кандидат биологических наук, доцент



С. Н. Филиппова

