

## ОТЗЫВ

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

**Соответствие диссертации специальности и отрасли науки.** Диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. представляет собой законченное исследование, посвященное выяснению физиолого-биохимических особенностей биосинтеза и функциональной роли вторичных метаболитов – флавоноидов в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного в условиях Беларуси и разработке научных основ их использования для получения лекарственных препаратов. По предмету исследования, кругу решаемых научных задач, применяемым методическим подходам диссертация Адамцевич Н.Ю. полностью соответствует отрасли – биологические науки, специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений согласно паспорту специальности, утвержденному приказом ВАК Республики Беларусь от 4 июля 2018 г. № 161. (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) и профилю Совета по защите диссертаций Д 01.38.01 при ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларусь».

**Актуальность темы диссертации.** Диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. посвящена актуальной проблеме современной физиологии и биохимии растений – научному обоснованию использования экстрактов из лекарственных растений (бессмертника песчаного и воробейника лекарственного) в качестве источников флавоноидов, обладающих ранозаживляющим действием. Проведенный автором скрининг коллекции фонда лекарственных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси показал, что надземные органы воробейника лекарственного содержат изокверцитрин, а бессмертника песчаного – гликозид кемпферола. В результате выполненного исследования автором установлены оптимальные условия сбора лекарственного сырья и разработаны эффективные методы экстракции целевых соединений. В этой связи актуальность диссертационной работы Адамцевич Н.Ю, посвященной научному обоснованию использования бессмертника песчаного и воробейника лекарственного в качестве источников флавоноидов, не вызывает сомнений.

**Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту.** Результаты, полученные в диссертации и выносимые на защиту, являются новыми.

Автором впервые установлена органоспецифичность распределения флавоноидов в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, произрастающих в центральной агроклиматической зоне Беларуси и определены органы растений с преобладающим содержанием целевых фенольных соединений. Впервые показано, что у бессмертника песчаного наиболее высоким содержанием флавоноидов, включая кемпферол-3-О-глюкозид, отличаются генеративные органы в период бутонизации, а у воробейника лекар-

ственного максимальное накопление этих соединений, включая изокверцитрин, наблюдается в листьях в период цветения.

Несомненный научный приоритет имеет экспериментально обоснованное использование СВЧ-излучения с частотой 2450 МГц для ускорения высвобождения из растительного сырья целевых компонентов, которое имеет целый ряд преимуществ по сравнению с экстрагированием при традиционном конвективном нагреве. Установлено, что оптимальная мощность микроволнового излучения не должна превышать 300 Вт, что способствует увеличению выхода изокверцитрина на 30 % у воробейника лекарственного при сокращении продолжительности процесса экстрагирования в 10 раз.

Впервые разработана и валидирована методика определения общего содержания флавоноидов в экстракте из листьев воробейника лекарственного методом дифференциальной спектрометрии по реакции образования окрашенного комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия. Экспериментально установлено, что реакцию комплексообразования целесообразно проводить в течение 40 мин, при этом отношение объема экстракта к объему раствора хлорида алюминия должно составлять 1 : 2.

Впервые научно доказана биологическая эффективность совместного использования экстрактов из генеративных органов бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, содержащих кемпферол-3-О-глюкозид и изокверцитрин соответственно, обладающих антимикробной и регенерирующей активностью, в качестве ранозаживляющего средства и разработан способ их практического использования.

В целом, в диссертации Адамцевич Н.Ю. впервые установлены физиологобиохимические закономерности динамики содержания и функциональной роли вторичных метаболитов – флавоноидов в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного в условиях центрального региона Беларуси и разработаны научные основы их использования для получения лекарственных препаратов ранозаживляющего действия.

**Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений и выводов диссертации обеспечена использованием большого набора современных и адекватных методов исследования, применением статистических методов обработки достаточно большого экспериментального материала с использованием компьютерных программ. Сделанные выводы вытекают из основного содержания диссертации, аргументированы и соответствуют цели и задачам работы.

**Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.** Результаты рецензируемой работы имеют как научную, так и практическую значимость.

Научная значимость полученных в работе результатов состоит в выявлении онтогенетических изменений содержания флавоноидов, включая кемпферол-3-О-глюкозид и изокверцитрин, в надземных органах бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, культивируемых в агроклиматических условиях Беларуси, что позволило определить органы и периоды развития растений с максимальным содержанием целевых соединений: у бессмертника песчаного – генеративные органы в период бутонизации, а у воробейника лекарственного – листья в период цветения.

Важно также отметить научную значимость результатов, полученных на основе сравнительного исследования деструктивных изменений растительной ткани сырьевых частей бессмертника песчаного и воробейника лекарственного методом сканирующей электронной микроскопии до и после экстрагирования с использованием конвективного нагрева и микроволнового излучения с частотой 2450 МГц, которые позволили опреде-

лить оптимальные значения мощности СВЧ-излучения до 300 Вт, что обеспечивает 10-кратное сокращение времени экстрагирования, увеличение общего выхода флавоноидов из генеративных органов бессмертника песчаного на 15 % и повышение содержания изокверцитрина в экстракте из листьев воробейника лекарственного на 30 %.

Важными в научном плане представляются результаты, указывающие на высокую антимикробную активность высушенного водно-этанольного экстракта из генеративных органов бессмертника песчаного после его очистки от балластных веществ в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* и *B. subtilis*), и на отсутствие таких свойств у экстрактов из листьев воробейника лекарственного, содержащего ценный флавоноид изокверцитрин, что определяет целесообразность совместного использования двух изученных экстрактов при разработке рецептуры ранозаживляющего геля.

В результате выполнения диссертационной работы получены экспериментальные данные, имеющие несомненное практическое значение для разработки новых ранозаживляющих лекарственных средств на основе совместного применения водно-этанольных экстрактов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного. Автором разработан состав геля ранозаживляющего действия для наружного применения, активными компонентами которого являются экстрактивные вещества из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного и получен патент на изобретение № 23846 С1 «Ранозаживляющий гель».

Следует также отметить практическую значимость разработки эффективного способа получения водно-этанольных экстрактов из растительного сырья с использованием микроволнового излучения, которая защищена патентом на изобретение № 23779 С1 «Способ получения сухого экстракта из соцветий бессмертника песчаного».

Важное практическое значение имеет также разработка и валидация методики определения общего содержания флавоноидов в экстрактах из листьев воробейника лекарственного методом дифференциальной спектрометрии.

Социальная значимость представленных в диссертации результатов состоит в формировании новых знаний, которые расширяют существующие представления о физиолого-биохимических особенностях накопления флавоноидов в растениях и могут быть использованы при чтении курсов лекций по физиологии и биохимии в ВУЗах республики. Результаты, полученные автором, внедрены на кафедре биотехнологии БГТУ в лекционный курс (раздел «Методы экстрагирования») и лабораторные практикумы по дисциплинам «Технология фитопрепаратов» и «Химия биологически активных веществ» (справки о внедрении от 04.09.2019 г., от 14.05.2019 г., от 01.12.2020 г.).

Результаты диссертационной работы также могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением роста и развития лекарственных растений, а также – в фармакогнозии.

**Опубликованность результатов диссертации в научной печати.** Основные результаты диссертационной работы Адамцевич Н.Ю. изложены в 22 научных работах, из них 7 статей в рецензируемых изданиях из перечня ВАК Беларусь; 3 статьи в рецензируемых журналах; 10 статей в сборниках материалов конференций и 2 тезисов докладов научных конференций. Общий объем опубликованных материалов составляет 7,4 авторских листа.

**Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.** Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Беларусь. Диссертационная работа содержит перечень сокращений и обозначений, введение, общую характеристику работы, основную часть работы, в которой представлены аналитический об-

зор литературы (глава 1), описание объектов и методов исследования (глава 2), основные результаты исследований и их обсуждение (главы 3–5), заключение, список использованных источников и 2 приложения. Работа изложена на 150 страницах печатного текста, содержит 50 рисунков и 35 таблицы. Библиографический список содержит 308 источников, из них 196 – на английском языке и 22 публикации соискателя.

Представленный в диссертации обзор литературы дает достаточно четкое представление о ботанических характеристиках бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.). В нем содержатся современные сведения о структуре, классификации и свойствах растительных флавоноидов, рассмотрены основные этапы биосинтеза и функции в растениях. Особое внимание уделено характеристике биологической активности флавоноидов, включая ранозаживляющее действие. Описаны наиболее эффективные методы экстрагирования флавоноидов из растительного сырья и их качественного и количественного анализа. Исходя из литературного обзора автором были логично сформулированы цели и задачи выполненного исследования.

Во второй главе подробно описаны объекты и методы исследования. Диссертационная работа Адамцевич Н.Ю. выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных методов анализа. Автором использованы современные, высокоточные методы исследования, включая хроматографический анализ содержания флавоноидов в растительном сырье (методы ВЭЖХ-МС и ТСХ), метод сканирующей электронной микроскопии с системой химического анализа для определения элементного состава золы и анализа деструкции растительной ткани после экстракции, а также комплекс физиологических и микробиологических методов. Это позволило автору сделать однозначные выводы на основе полученных экспериментальных данных.

Экспериментальная глава 3 посвящена изучению сезонной динамики накопления целевых компонентов флавоноидного комплекса в надземных органах бессмертника песчаного и воробейника лекарственного. В результате проведенного исследования автором обнаружено, что максимальные параметры общего накопления флавоноидов, в том числе кемпферол-3-О-глюкозида, у растений бессмертника песчаного установлены в период массовой бутонизации, а наибольшее содержание флавоноидов, в том числе изокверцитрина, у растений воробейника лекарственного выявлено в период цветения.

Экспериментальная глава 4 содержит результаты изучения разных способов экстрагирования флавоноидов из сырья бессмертника песчаного и воробейника лекарственного. В результате проведенных экспериментов с использованием хроматографического анализа автором установлены оптимальные режимы экстракции флавоноидов из генеративных органов бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, обеспечивающие максимальное получение целевых соединений. Научно обоснована высокая эффективность использования СВЧ-излучения, обеспечивающего 10-кратное сокращение времени экстрагирования и увеличение общего выхода флавоноидов из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного по сравнению с традиционным конвективным нагревом.

Экспериментальная глава 5 посвящена изучению антимицробной активности и ранозаживляющего действия растительных экстрактов из сырья бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного. В диссертации представлен детальный анализ влияния растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, по отношению к грамположительным бактериям (*S. aureus* и *B. subtilis*), к грамотрицательным бактериям

(*E. coli*, *P. aeruginosa*) и дрожжеподобным грибам (*C. albicans*). Автором экспериментально доказана высокая antimикробная активность высушенного водно-этанольного экстракта из соцветий бессмертника песчаного после очистки от балластных веществ в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* и *B. subtilis*). На основе проведенных исследований разработан состав геля, в который входят в количестве 2–4 % от массы геля высушенные водно-этанольные экстракты из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в массовом отношении 1 : 1, а также парабены в качестве консервантов и пропиленгликоль. В опытах на экспериментальных животных убедительно доказана эффективность разработанного геля, обеспечивающего сокращение времени заживления линейных ран.

В целом, работа хорошо оформлена, написана четким и ясным языком. Изложение экспериментальных результатов выстроено в логической последовательности, все обсуждаемые положения и выводы хорошо проиллюстрированы в 35 таблицах и 50 рисунках.

Автореферат диссертации отражает суть работы, ее результаты и основные положения, которые автор выносит на защиту.

В диссертации соискатель ученой степени приводит ссылки с указанием авторов и источников, материалы которых он использует, а также на собственные публикации, в которых содержатся материалы, излагаемые в диссертации.

При использовании в диссертации результатов, принадлежащих лицам, совместно с которыми были написаны научные работы, автор ссылается на них и отмечает это в диссертации и автореферате ссылкой на источник.

В диссертации соискатель ученой степени приводит ссылки с указанием авторов и источников, материалы которых он использует, а также на собственные публикации, в которых содержатся материалы, излагаемые в диссертации.

При использовании в диссертации результатов, принадлежащих лицам, совместно с которыми были написаны научные работы, автор ссылается на них и отмечает это в диссертации и автореферате ссылкой на источник.

Текст диссертации и автореферата проверен на наличие нелегитимных заимствований (плагиата) с использованием модулей поиска: Интернет Плюс, Модуль поиска "НББ", Диссертации НББ, Кольцо вузов, eLIBRARY.RU, Сводная коллекция РГБ, Перефразирования по Интернету, Патенты СССР, РФ, СНГ, Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Сводная коллекция ЭБС, Медицина, Библиография, ИПС Адилет, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Издательство Wiley, Переводные заимствования.

Исходя из представленного отчета проверки, оригинальность текста диссертации составила 71,90 %, самоцитированных фрагментов – 14,85 %, фрагментов цитирования не выявлено. Блоки размером 0,11–0,84 % – общепринятые фразы, которые используются при описании и цитировании материалов, методов и результатов исследований, оформленные по ГОСТу цитаты; остальные фрагменты заимствований – также могут быть отнесены к общеупотребительным выражениям, фрагментам текста, использование которых является корректным. С учетом самоцитирования оригинальность диссертационной работы Адамцевич Н.Ю. составляет 92,67 %.

В результате анализа диссертационной работы Адамцевич Н.Ю. возникли некоторые дискуссионные вопросы и замечания:

1. Хотелось бы уточнить, почему при описании методов получения экстрактов из растительного сырья (раздел 2.3.2, стр. 48) в качестве экстрагента указан 70% этиловый спирт, а в разделе 2.3.3. (стр. 49) при описании метода анализа образцов с помощью ТСХ сухие экстракты растворяли уже в 50% этиловом спирте.

2. Не совсем понятно, почему в разделе 2.3.9 при описании методики получения лабораторных образцов геля для заживления ран автор указывает концентрации сухих экстрактов 2% и 4% (стр. 52), а в разделе 2.3.10 (стр. 54) для оценки ранозаживляющего действия на базе ГУ «НПЦ ЛОТИОС» использовался гель с содержанием сухих экстрактов в концентрациях 1% и 2%, а на базе ГНУ «Институт физиологии НАН Беларусь» – уже 2% и 4% (стр. 55).

3. Как убедительно показал автор в своих исследованиях с использованием метода ВЭЖХ-МС (стр. 63), сухие экстракты из цветков бессмертника песчаного наряду с кемферол-3-О-глюкозидом содержат 5-О-глюкозиды наргенина, кверцицин-3-О-галактозид и апигенин-7-О-глюкозид, а в экстрактах из листьев воробейника лекарственного наряду с изокверцитрином содержится также рутин (стр. 72). Все эти соединения обладают высокой биологической активностью, в т.ч. противовоспалительным и гематопротекторным действием. В этой связи не совсем понятно, почему автор выделяет кемферол-3-О-глюкозид и изокверцитрин как соединения, способствующие ранозаживляющему действию геля.

4. В работе проведен детальный анализ содержания макро- и микроэлементов в золе из соцветий бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного. При этом автор указывает на отчетливую зависимость содержания флавоноидов в генеративных органах бессмертника песчаного от содержания меди (стр. 68), а также делает заключение, что при наиболее низком содержании фосфора и калия в листьях воробейника лекарственного наблюдается максимальное количество флавоноидов. Эти наблюдения следовало бы, на наш взгляд, подтвердить методом корреляционного анализа, что существенно бы повысило их научную значимость.

5. Следует также уточнить вопрос, чем обусловлен диапазон и неравномерный интервал изменения температур (табл. 4.2, стр. 86; табл. 4.12, стр. 95) при оценке влияния продолжительности воздействия СВЧ-излучения на выход флавоноидов из растительного сырья.

В диссертационной работе имеются также немногочисленные опечатки (на стр. 48, 49, 53, 67, 69, 85, 106).

Высказанные замечания, однако, не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту, а некоторые из них могут быть уточнены в дискуссии.

**Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.** Считаю, что диссертация Адамцевич Натальи Юрьевны «Бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.) и воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) как источники флавоноидов, обладающих ранозаживляющим действием», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, является законченным научным трудом и по актуальности темы, объему и значимости полученных результатов отвечает требованиям ВАК Беларусь, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы Адамцевич Н.Ю. является высококвалифицированным специалистом в области физиологии и биохимии растений и заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений за новые научно обоснованные результаты включающие:

– обнаружение органоспецифичности распределения флавоноидов в растениях бессмертника песчаного и воробейника лекарственного, произрастающих в центральной агроклиматической зоне Беларуси, и определение органов растений с преобладающим содержанием целевых фенольных соединений;

– экспериментальное обоснование использования СВЧ-излучения с частотой 2450 МГц для ускорения высвобождения из растительного сырья целевых флавоноидов, включая 3-О-гликозид кемпферол и изокверцитрин, которое имеет целый ряд преимуществ по сравнению с экстрагированием при традиционном конвективном нагреве;

– разработку и валидацию методики определения общего содержания флавоноидов в экстракте из листьев воробейника лекарственного методом дифференциальной спектрометрии по реакции образования окрашенного комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия;

– доказательство биологической эффективности совместного использования экстрактов из генеративных органов бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, содержащих кемпферол-3-О-гликозид и изокверцитрин соответственно, и обладающих антимикробной и регенерирующей активностью, в качестве ранозаживляющего средства и разработку способа их практического использования,

что в совокупности расширяет научные представления о физиологобиохимических закономерностях динамики содержания вторичных метаболитов – флавоноидов в лекарственных растениях и их биологической активности и создает научную основу для разработки лекарственных фитопрепаратов.

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

Официальный оппонент,  
заведующий лабораторией прикладной  
биофизики и биохимии ГНУ «Институт  
биофизики и клеточной инженерии  
НАН Беларусь», член-корр., д.б.н.,  
доцент

Л.Ф. Кабашникова

Боднарь Кабашникова Л.Ф.  
уровень доверия.  
Зап. докт. по науч. работе Л.М. Чумакенко

