

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук, доцента Гудковой Алевтины Алексеевны на диссертационную работу Некрасовой Дарьи Алексеевны на тему «Получение и фитохимический анализ каллусных культур аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb. как перспективного растительного сырья», представленную в диссертационный совет 21.2.063.01, созданный на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность темы исследования

Растительные организмы обладают уникальной способностью к биосинтезу вторичных метаболитов – различных по природе органических соединений, обладающих разнообразной биологической активностью.

Высокое разнообразие фармакологических эффектов среди представителей биологически активных молекул проявляют терпеноиды. Данная группа насчитывает более 23 тысяч веществ с установленным химическим строением.

Одной из причин интереса к терпеноидам, как к биологически активным веществам, являются адаптогенные, цитотоксические, противодиабетические, противовоспалительные и др. свойства препаратов на основе растений семейства *Araliaceae* - женьшеня обыкновенного, элеутерококка колючего, заманихи высокой, аралии маньчжурской и плюща обыкновенного, действующим началом которых являются тритерпеноиды.

Одним из представителей семейства также является *Aralia cordata* - многолетнее травянистое растение, имеющее восточно-азиатский островной тип ареала. В настоящее время растение внесено в Красную книгу России.

Особый охранный статус аралии сердцевидной объясняется сложностью возобновления естественных популяций, связанных с наличием периода морфофизиологического покоя и природной недоразвитостью зародыша.

Трудоемкость культивирования, ограниченность природного ареала и большое практическое значение вторичных метаболитов аралии сердцевидной ставит вопрос о целесообразности введения данного вида в культуру *in vitro*.

Культуры *in vitro* редких и труднокультивируемых видов растений можно рассматривать в качестве потенциального источника получения фармакологически значимых активных молекул.

Цель исследования

Цель исследования состояла в изучении каллусной культуры аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) в качестве потенциального источника растительного сырья.

Научная новизна исследования

Впервые получена стабильная каллусная культура из листьев интактного растения *Aralia cordata* на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина;

Впервые изучено влияние различных добавок на микроскопические, макроскопические признаки, ростовые характеристики и жизнеспособность культуры.

Физико-химическими методами впервые установлено, что культуры накапливают тритерпеновые гликозиды, проведен качественный и количественный анализ биологически активных веществ в сравнении с листьями интактного растений и корнями аралии маньчжурской.

Анализ экспрессии гена β -амиринсинтазы в каллусных культурах показал, что данный ген задействован в биосинтезе тритерпеновых

гликозидов в культурах, однако низкий уровень экспрессии гена в сравнении с интактным растением и высокий уровень содержания тритерпеноидов позволяет предположить наличие иных механизмов биосинтеза данной группы биологически активных веществ.

Определение биологической активности экстракта из каллусной культуры аралии сердцевидной показало наличие выраженной актопротекторной активности сухого экстракта при изнурительных физических нагрузках.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 5 – Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье и пункту 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе работы подтверждено, что культуры являются продуцентами тритерпеновых гликозидов, а модификация условий культивирования оказывает влияние на морфологию культур, скорость и количество накапливаемой целевой группы биологически активных веществ. Фитохимический анализ показал, что качественный и количественный состав культур приближен к составу листьев интактного растения аралии сердцевидной.

С использованием методов ВЭТСХ и ВЭЖХ-УФ подтверждено наличие в культурах аралозидов А, который может использоваться для

последующей стандартизации и являться маркером доброкачественности культур как лекарственного растительного сырья.

Результаты, полученные в ходе работы, использованы для составления паспорта каллусной культуры *Aralia cordata* Thunb., в котором отражены все основные морфологические, ростовые и биосинтетические характеристики.

Выявленная актопротекторная активность позволяет рассматривать полученные культуры в качестве сырья для получения фитопрепаратов для повышения физической работоспособности.

Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры фармакогнозии и лаборатории культур растительных клеток федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 22.05.2024 г.).

Рекомендации по использованию результатов для науки и практики

Результаты исследования соискателя представляют практический интерес для отечественной фармации в направлении поиска альтернативных ресурсных баз редких видов растений.

Полученная культура является источником тритерпеновых гликозидов и может быть использована для получения фитосубстанции с актопротекторной активностью.

Разработанный паспорт каллусной культуры может быть использован для получения патента и разработки нормативной документации для регламентации качества субстанции.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в формулировке цели исследования и постановке задач, сборе и анализе литературных данных, планировании экспериментальной работы, постановке экспериментов, обработке и

интерпретации полученных результатов. Автор лично осуществлял написание тезисов и статей по тематике исследования. Личный вклад автора составил не менее 90%.

Степень обоснованности научных положений, выводов, и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование выполнено соискателем на современном научном уровне. Основные выводы и научные положения, изложенные в работе, подтверждены и обоснованы полученными в ходе работы экспериментальными данными. Достоверность результатов исследования определяется воспроизводимостью данных, использованием современных физико-химических, молекулярно-генетических и аналитических методов исследования, методов статистической обработки данных, применением аттестованного аналитического оборудования, поверенных средств измерений.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, среди которых 1 статья в издании, включенном в международную наукометрическую базу данных Scopus.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературных данных, главы «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, списка литературы.

Во **введении** сформулированы актуальность выбранной темы исследования, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость; приведены методы исследования, степень достоверности и

апробация полученных результатов; обозначено соответствие работы паспорту научной специальности; изложены основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор современных литературных данных, касающихся ботанического описания, химического состава, биологической активности компонентов сырья аралии сердцевидной и опытов по *in vitro* культивированию представителей рода *Aralia*.

Во **второй главе** приведены характеристики объектов исследования – первичных эксплантов, использованных для получения каллусов и непосредственно самих полученных культур, описаны материалы и методы исследования, используемые в работе.

В **третьей главе** изложены результаты, полученные в ходе работы. Соискателем установлено, что использование модификаторов питательных сред приводит к изменению морфологических характеристик культуры – внешнего вида, структуры, микроскопических признаков; изменяется скорость накопления биологически активных веществ. Фитохимический анализ с использованием физико-химических методов показал наличие в культурах тритерпеновых гликозидов, схожих по своему составу с компонентами листьев интактного растения. Определено, что количество тритерпеновых гликозидов в культурах превышает таковое в сырье аралии маньчжурской. Показано, что сухой экстракт каллусов аралии сердцевидной обладает актопротекторной активностью при физических нагрузках.

В **заключении** обобщены основные результаты работы.

Автореферат отражает основное содержание работы.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации

Отмечая новизну исследования и полученных результатов, а также практическую значимость диссертационной работы Некрасовой Д.А., при подготовке отзыва возникли следующие вопросы и замечания:

1. Известно, что к применению в медицинской практике допускаются корни аралии высокой, чем обусловлен выбор в качестве объекта исследования аралии сердцевидной? Кроме того, основная часть исследований видов рода Аралия, описанных в литературе, направлена на изучение подземной части растений, почему автор для получения каллусной культуры использует листья растения?

2. При изучении химического состава каллусных культур аралии сердцевидной листьев автор проводит сравнение с листьями интактного растения и корнями аралии высокой. Нет ли данных по сравнительному анализу химического состава (а именно количественного содержания БАВ) изучаемых объектов с листьями аралии высокой? На взгляд рецензента это было бы логично.

3. Почему при проведении ВЭТСХ автор использует в качестве детектирующего реагента раствор 10% серной кислоты в метаноле, в то время как, реагент не совсем специфичен для тритерпеновых гликозидов, окрашивая и сопутствующие соединения, более часто разными авторами используется 0.2% раствор пара-оксибензальдегида в 1М серной кислоте, а также насыщенный раствор фосфорно — вольфрамовой кислоты.

4. При изучении извлечений из каллусных культур аралии сердцевидной и интактных растений методом ВЭТСХ автором было установлено отсутствие Аралозида А в каллусной культуре, выращенной в среде Линсмайера – Скуга с добавлением кокосовой воды (табл.24). При этом, в результате количественного определения аралозида А в данном образце методом ВЭЖХ было установлено содержание Аралозида А. С чем автор связывает подобные результаты?

5. С чем связано использование экстракта левзеи, а не лекарственных средств на основе аралии высокой, при оценке актопротекторной активности экстракта из каллусных культур аралии сердцевидной?

6. Автор пишет «...наилучшее соотношение прироста биомассы и количественного содержания тритерпеноидов показала культура на среде с

кокосовой водой, поскольку дает наибольшее значение индекса роста...», однако, следует отметить, что, согласно данным таблицы 41, указанная культура выигрывает в основном по параметру «Прирост биомассы», количественное содержание аралозидов, установленное методом ВЭЖХ – УФ, ВЭЖХ – МС, сходно со значениями, полученными для культур на среде ЛС, а содержание аралозида А в 2 раза ниже, чем на среде ЛС (с учетом того, что прирост биомассы почти в 3 раза выше, чем на остальных средах). На взгляд рецензента целесообразнее было использовать каллусную культуру, выращенную на среде ЛС без каких-либо добавок. Как автор может это прокомментировать?

Указанные вопросы замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Учитывая все вышеизложенное, можно сделать заключение, что диссертационная работа **Некрасовой Дарьи Алексеевны** на тему: «Получение и фитохимический анализ каллусных культур аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) как перспективного растительного сырья» является законченным научным исследованием, имеющим существенное значение для развития фармацевтической науки и практики в области поиска альтернативных источников сырья редких и исчезающих видов растений. В диссертации решена важная научная задача, состоящая в получении, исчерпывающем фитохимическом анализе культур тканей аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) и оценке возможности их применения в качестве источника ценных биологически активных соединений.

По актуальности и важности темы, объему и глубине исследования, теоретической и практической значимости, обоснованности и достоверности результатов и выводов диссертационная работа **Некрасовой Дарьи Алексеевны** соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, **Некрасова Дарья Алексеевна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Воронежский государственный университет»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,
доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия),
доцент

Гудкова А.А.

«28.11.2024»

Почтовый адрес: 394018, Российская Федерация, Воронежская область, г. Воронеж,
Университетская пл., 1.
Телефон: +79107316164
e-mail: al.f84@mail.ru

