

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора фармацевтических наук, профессора кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Пупыкиной Киры Александровны на диссертационную работу Борисова Михаила Юрьевича на тему: «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича посвящена фармакогностическому исследованию корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.) сем. Имбирные (*Zingiberaceae*) как источника биологически активных соединений и обоснованию использования сырья в отечественной научной медицине и фармации.

Актуальность выполненного исследования.

Решение актуальной задачи импортозамещения в сфере лекарственного обеспечения и, в частности, разработки отечественных, эффективных и безопасных, лекарственных препаратов на растительной основе, обуславливает необходимость дальнейшего углубленного фармакогностического и фармакологического изучения (а также расширения эксплуатационного запаса) уже используемых в научной фармации и медицине лекарственных растений и поиска новых источников природных биологически активных соединений (БАС). В этом плане перспективным представляется обращение к пищевым растениям, и, в частности, к куркуме длинной, корневища которой являются популярной пряностью и широко используется в традиционных медицинских системах ряда стран, включена в целый ряд зарубежных фармакопей. Предпосылками для выполнения диссертационного исследования по экспериментальному и теоретическому обоснованию использования корневищ куркумы в отечественной научной фармации в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) служили многочисленные литературные данные по лечебным свойствам растения в отношении широчайшего спектра заболеваний, его относительная безопасность (многовековой опыт употребления в пищу), обширные мировые запасы сырья и возможность культивирования на территории Российской Федерации и сопредельных государств в районах с субтропическим климатом. Также автором диссертационного исследования во

внимание были приняты ранее опубликованные данные отечественных исследователей и, в частности, пятигорских коллег (Орловская Т.В. и др., 2008-2011 гг.) по обоснованию целесообразности придания данному сырью статуса официального вида ЛРС. В определенной мере настоящая работа является продолжением и развитием обозначенного направления (на что М.Ю. Борисов приводит в работе корректные ссылки).

Ко времени начала настоящего диссертационного исследования куркумы длинной по ряду вопросов данные носили неполный или противоречивый характер, в частности, касающихся морфолого-анатомического и фитохимического изучения параметров качества сырья (включая разработку отечественного стандартного образца куркумина), идентичности химического состава импортируемых образцов (традиционных ареалов произрастания/выращивания) и отечественных образцов сырья (культивируемых растений на территории Северного Кавказа), обоснования путей переработки сырья для получения отечественных лекарственных препаратов и собственно составление фармакопейной статьи «Куркумы длинной корневища» в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу. Весь обозначенный комплекс проблем и определил целевые установки диссертационного исследования М.Б. Борисова.

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность.

Впервые автором проведено сравнительное фармакогностическое исследование импортируемого сырья растений природных ареалов обитания (родиной растения является Юго-Восточная Азия, промышленные плантации сосредоточены в Индии, Китае, Вьетнаме и ряде других стран с субтропическим климатом) и сырья куркумы длинной, выращенной на территории Северного Кавказа (заготовлены в 2007-2014 гг.).

По результатам морфолого-анатомических исследований корневищ куркумы были выявлены характерные диагностические признаки для цельного, измельченного и порошкового сырья: наличие в паренхиме клеток с извилистыми стенками и структурированным, окрашенным содержимым (куркуминоиды), пигментных клеток с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета, закрытых коллатеральных пучков, проводящие элементы которых состоят из узкопросветных волокон, в сосудах встречаются пигментные клетки. Интересны данные по выявленным анатомо-гистологическим отличиям в сырье различных способов заготовки и приведения в стандартное состояние.

В изучении химического состава БАС акцент сделан на наиболее значимой группе действующих веществ – на куркуминоидах (гептадиеновые соединения фенольной природы). При изучении отечественных видов сырья с

помощью сочетания хроматографических (в варианте колоночной хроматографии под контролем ТСХ-анализа) и экстракционных методов выделены и очищены три доминирующих куркуминоида – куркумин, дезметоксикуркумин, бисдезметоксикуркумин (доминирующий из них куркумин предложен в качестве отечественного стандартного образца - СО). С использованием структурных методов анализа установлена структура указанных индивидуальных соединения, изучены физико-химические свойства, определено их количественное соотношение (по результатам ВЭЖХ-анализа: $63,0 \pm 3,0\%$ куркумин, $22,0 \pm 2,5\%$ дезметоксикуркумин, $15,0 \pm 3,0\%$ - бисдезметоксикуркумин), что характеризует родовую и видовую принадлежность куркумы длинной.

При адаптации ранее предложенных методик качественного (ТСХ-анализ) и количественного анализа (дифференциальная спектрофотометрия) по содержанию куркуминоидного комплекса в сырье растений природных ареалов произрастания при решении автором проблемы стандартизации отечественного сырья культивируемых растений установлено, что по компонентному составу и количественному содержанию данной группы БАС исследуемое сырье идентично образцам из Индии, Вьетнама и некоторым другим импортируемым коммерческим образцам пряностей. Установлена норма содержания суммы куркуминоидов в пересчете на СО куркумин не менее 2,0 %, а также внесены некоторые изменения в параметры обеих методик анализа.

Изученные параметры качества, касающиеся разделов химической стандартизации, и другие установленные показатели, нормируемые для ЛРС, и разработанные способы их оценки были использованы для составления проекта ФС «Куркумы длинной корневища», распространяющегося на сырье культивируемых растений, а также показали, что на территории Российской Федерации возможно выращивание сырья с показателями качества, не уступающими большинству импортируемых образцов.

В плане дальнейших исследований по использованию сырья растения для получения лекарственных препаратов с учетом высокой липофильности, нестабильности и низкой биодоступности куркуминоидов автором предложено получение экстракционного препарата «Куркумы экстракта густого» на 95 % спирте этиловом методом циркуляционной экстракции; причем получение извлечения предложено проводить в слабокислой среде, создаваемой хлороводородной кислотой, для исключения таутомерных превращений целевой группы веществ. В модельных системах, инициирующих свободно-радикальное окисление, хемилюминисцентным методом доказана высокая антиоксидантная активность в сравнении с альфа-токоферола ацетатом и цианидиновым комплексом черники, а также превосходящая таковую у эквивалентных доз жидкого экстракта корневищ куркумы (что доказывает

правильность выбора при получении экстракционных препаратов в пользу густого экстракта). Для дальнейшего использования экстракта куркумы густого в медицинской практике предложено использование лекарственной формы «суппозитории» (назначение - лечение колоректального рака); выбранная по результатам изучения высвобождения и фармацевтической доступности в качестве оптимальной гидрофильная основа позволяет ввести в препарат терапевтические дозировки куркуминоидов и обеспечить доставку и высвобождение БАС к месту поражения.

Обсуждаемые в работе результаты получены с использованием адекватного набора физических, химических и физико-химических методов анализа. В частности, изучение микродиагностических признаков и получение микрофотографий проведено с помощью цифрового микроскопа «Motic DM111» (Корея) и цифрового стереоскопического микроскопа «Motic DM-39C-N9GO-A» (Корея). Структурные исследования выделенных веществ осуществляли с использованием ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР- спектроскопии (ЯМР-спектрометр «Bruker AM 300», 300 МГц), масс-спектрометрии (Kratos MS-30 (UK) 70 eV T=2000C), ИК-спектроскопии (ИК-Фурье-спектрометр «Nikolet iS10» фирмы «Thermo Spectronic Company»). Изучение химического состава и решение проблемы стандартизации проводилось с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии («Biotronic»), газовой хроматографии с масс-селективным детектированием («МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975), спектрометрии (спектрофотометры «Specord 40» фирмы «Analytik Jena»), а также некоторых химических реакций.

Кроме того, применялось сочетание различных технологических методов, а при изучении *in vitro* антиоксидантной активности по влиянию на Fe^{2+} – индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) использован отечественный аппаратно-программный комплекс «ХЛМ-003» и две тест-системы, инициирующие свободно-радикальное окисление (СРО) – образование активных форм кислорода (АФК) и перекисного окисления липидов (ПОЛ).

При этом использовалась приборная база не только по основному месту выполнения исследования (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России), но и других организаций.

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

Положения и выводы в диссертационной работе базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, достоверность результатов обеспечивается использованием адекватного набора современных методов анализа и статистической обработкой данных в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII издания с помощью программ Microsoft Excel при $P=95\%$ с

вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения. Апробированные методики количественного определения валидированы.

Полнота и глубина собственного материала в достаточной мере обосновывает выводы и рекомендации, вытекающие из полученных автором диссертации результатов.

Основные результаты диссертационного исследования достаточно полно обсуждены на научно-практических конференциях различного уровня.

Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования.

Диссертантом проведен комплекс исследований в сравнительном аспекте для сырья растений природных ареалов произрастания и культивируемых на территории Северного Кавказа: выявлены дополнительные диагностически значимые анатомо-гистологические признаки, осуществлено препаративное выделение индивидуальных соединений – трех куркуминоидов, и доминирующий из них – куркумин предложен в качестве отечественного стандартного образца и обосновано его использование для решения проблемы стандартизации сырья и экстракционных препаратов куркумы длинной (по содержанию куркуминоидов), разработаны оптимальные условия получения суммы куркуминоидов и на этой основе с учетом их физико-химических характеристик (особо - растворимость, стабильность при варьировании факторов среды) - предложен способ получения «Куркумы экстракта густого» (с высокой антиоксидантной активностью в эксперименте), обосновано последующее его включение в ректальные суппозитории. Основным результатом фармакогностических исследований явилась разработка проекта фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Куркумы длинной корневища» и экспериментальное и теоретическое обоснование рациональных путей использования ценного растения в отечественной научной медицине и фармации.

В этой связи материалы представленного исследования имеют несомненное научно-практическое значение. В настоящее время результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедр фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, а также в работу предприятия ЗАО "Самаралектравы" (Самарская обл., с. Антоновка) и Института ботаники Академии наук Абхазии (г. Сухуми).

Рекомендуется дальнейшее внедрение результатов проведенного исследования в учебный процесс других вузов страны на этапах додипломной и

профессиональной подготовки специалистов по специальности «фармация», а также в научно-исследовательскую работу учебных и научных организаций, специализирующихся на изучении и использовании лекарственного растительного сырья. В дальнейшем, по завершении работ по созданию отечественных лекарственных средств на основе куркумы длинной, включая экспериментальную и клиническую апробацию лекарственных препаратов (что в задачи настоящего исследования не входило), целесообразным представляется внедрение разработок в фармацевтическую (и пищевую) промышленность и выведение новых оригинальных препаратов на фармацевтический рынок.

Оценка содержания диссертации.

Диссертационная работа изложена на 140 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, общих выводов, списка литературы; некоторые материалы вынесены в приложения. Работа хорошо проиллюстрирована, содержит 14 таблиц, 37 рисунков. Список цитируемой литературы включает 150 библиографических источников, 112 из которых - на иностранных языках, что отражает доминирование в мировом публикационном потоке по тематике исследования куркумы работ зарубежных авторов (полезным и удобным является использование в приложении № 5 по спектру проводимых за рубежом исследований фармакологических свойств интерактивных ссылок на зарубежные данные).

Во введении диссертации раскрывается актуальность темы исследования, степень ее разработанности, цель и задачи работы, методология и методы исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования и их внедрение, положения, выносимые на защиту, дана информация по структуре работы и ее соответствии паспорту специальности, приведены сведения по апробации и публикациям.

Первая глава (обзор литературы) содержит критический анализ состояния исследований (на момент начала выполнения диссертационной работы) куркуме длинной; приводится ботаническое описание, культивирование и заготовка, химический состав корневищ растения, структура и свойства куркуминоидов, применение в медицине и других сферах народного хозяйства, — все это явилось исходными предпосылками для планирования проведения собственных научных исследований.

Во второй главе дано описание объектов и методов исследования, указаны базы проведения экспериментов, приборная база.

Третья глава отражает данные морфолого-анатомического анализа сырья культивируемых растений разной степени измельчения; выявленные диагностически значимые признаки иллюстрированы микрофотографиями.

В четвертой главе приводятся данные фитохимического исследования куркумы длинной как источника БАС, особое внимание уделено изучению куркуминоидного состава и доминирующего соединения – куркумина, рассматриваемого в качестве отечественного стандартного образца.

Пятая глава включает данные исследований по стандартизации корневищ куркумы длинной, обоснование параметров качества и методов их оценки, в т.ч. с использованием РСО куркумина.

Шестая глава посвящена обсуждению путей использования корневищ куркумы длинной для получения отечественных лекарственных препаратов на примере куркумы экстракта густого, обсуждается его антиоксидантная активность, обосновывается выбор лекарственной формы (суппозитории) – перспективных для дальнейшего изучения в плане использования в лечении колоректального рака.

Каждая глава диссертации завершается выводами, которые полностью отражают содержание главы. Заключение и выводы соответствует основным результатам проведенных автором исследований и раскрывает поставленные в диссертационном исследовании задачи и цель.

Приложения содержат акты внедрения результатов диссертационной работы, проект фармакопейной статьи, систематизированные данные по спектру фармакологической активности различных субстанций куркумы длинной.

Основные результаты исследования представлены в 12 работах, из которых 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России. Автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. В целом диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, представленный материал изложен последовательно, логично и грамотно.

В процессе ознакомления с работой возникли некоторые замечания и требующие пояснения вопросы:

1. При изучении компонентного состава эфирного масла образцов сырья культивируемых на территории Северного Кавказа растений (стр.72), Вами для исследования с помощью ГХ/МС была выбрана фракция, полученная с помощью колоночной хроматографии и соответствующая пятну с R_f около 0,9 на пластине при анализе методом ТСХ. Хотелось бы уточнить, какую фракцию Вы изучали и чем извлекали из сырья?

2. При обосновании параметров методики количественного определения куркуминоидов (стр. 94-95) в качестве оптимальных для извлечения Вы

рекомендуете: время экстракции - 30 мин, соотношение сырье – экстрагент - 1:30, а почему в методике первоначально берете объем экстрагента 50 мл, затем предлагаете фильтровать и доводить объем до 30 мл? Непонятно, как Вы доводите объем до 30 мл, если это не мерная колба, или доводите до первоначального объема по весу?

3. Объясните, почему при разработке технологического способа получения «Куркумы экстракта густого» при применении разных методов получения используются разные экстрагенты: при получении в аппарате Сокслета - 95% спирт этиловый (при описании способа приготовления - 96% спирт этиловый), а при использовании реперколяции и модифицированной мацерации – 80% спирт этиловый?

4. При оценке антиоксидантной активности «Куркумы экстракта густого» Вы сравниваете его с экстрактом куркумы жидким и препаратом сравнения - альфа-токоферола ацетатом, а в качестве чего Вы используете еще антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной?

5. При разработке технологии получения суппозиторий на основе экстракта куркумы густого Вами обсуждаются разные концентрации густого экстракта, вводимого в состав суппозиторий на липофильной и гидрофильной основе, затем при исследовании фармацевтической биодоступности суппозиторий, также берутся разные концентрации и определяются параметры окрашенных в желто-оранжевый цвет зон куркуминоидов, но непонятно, какая концентрация густого экстракта выбрана оптимальной для приготовления суппозиторий?

Имеются замечания редакционного плана, которые не принципиальны и не снижают ценности настоящей диссертационной работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации.

Содержание автореферата полностью соответствует и отражает основные положения и выводы диссертации и, также как и диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича, соответствует заявленной специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия (паспорт специальности: 2, 3, 6 и 7).

Заключение о соответствии диссертации требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

Диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича на тему: «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия,

фармакогнозия, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной задачи фармацевтической науки – фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной как сырьевого источника биологически активных соединений и обоснование их использования в качестве лекарственного растительного сырья.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Борисова Михаила Юрьевича соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Борисов Михаил Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

*профессор кафедры фармакогнозии с курсом
ботаники и основ фитотерапии федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования*

*«Башкирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации*

*450077, г. Уфа, ул. Ленина, 3
(83472) 2721160,*

e-mail: rectorat@bashgmu.ru

*доктор фармацевтических наук,
профессор (15.00.02 – фармацевтическая
химия, фармакогнозия)*

Дата:

« 04 » октября 2017 г.

Пупыкина Кира Александровна

