

№ 9	Вкл. № 37
05	05 2022
"Самарский государственный медицинский университет" Министерство здравоохранения Российской Федерации	
Тел./факс: 8 (846) 333-29-76	

ОТЗЫВ

официального оппонента заведующего кафедрой фармакогнозии, доктора фармацевтических наук, профессора, Белоноговой Валентины Дмитриевны по диссертации Рябова Николая Анатольевича на тему:

«Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, по специальности 3.4.2– Фармацевтическая химия, фармакогнозия

1. Актуальность выполненного исследования

Поиск новых видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), их стандартизация и фармакологическое обоснование медицинского применения является актуальной задачей фармации.

Наряду с огромным перечнем отечественных лекарственных растительных объектов перспективным является дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) семейства Буковые (*Fagaceae*). Дуб черешчатый широко распространён в Западной Европе и европейской части России, является одной из основных лесообразующих пород широколиственных лесов Европы. На территории РФ, в том числе и в Самарской области, помимо дуба черешчатого, успешно культивируются и другие виды рода *Quercus*: дуб скальный - *Quercus petraea* Liebl.; дуб красный - *Quercus rubra* L.; дуб летний фастигиата - *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; дуб монгольский - *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.; дуб крупноплодный - *Quercus macrocarpa* Michaux и дуб Мюлленберга - *Quercus Muehlenbergii* Engelm.

Дуб черешчатый входит в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) и в фармакопеи ряда зарубежных стран. Кора дуба черешчатого обладает ценными фармакологическими свойствами, такими как противовоспалительное и вяжущее. Фармакологические свойства связаны с особенностями химического состава, который представлен широким спектром БАВ, в частности, биологически активными веществами фенольной природы

Помимо коры дуба черешчатого представляют интерес другие морфологические органы растения листья, почки, многолетняя стволовая кора, которые не являются фармакопейными видами сырья.

Отсутствие нормативной документации на листья и почки дуба черешчатого не позволяет использовать их в официальной медицине, поэтому направление диссертационной работы Рябова Николая Анатольевича, ориентированное на поиск новых перспективных БАВ, изучение вопросов диагностики и стандартизации сырья с использованием морфолого-анатомических, физико-химических и фармакологических

методов в целях комплексного использования фитомассы дуба черешчатого – листьев, почек и многолетней коры является актуальным..

Таким образом, углубленное фармакогностическое изучение ЛРС дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) является актуальной задачей, решение которой позволит расширить спектр применяемых видов ЛРС дуба черешчатого в отечественной фармации.

2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Впервые из листьев дуба черешчатого выделены 3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и моносахарид рамноза. Впервые в РФ из листьев дуба черешчатого выделен астрагалин (3-О- β -D-глюкопиранозид кемпферола), который определен как диагностически значимое вещество для листьев дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus* (отмечено его наличие во всех исследуемых видах, кроме дуба красного), а также флавоноиды афзелин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона), кверцитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), изокверцитрин (3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), и 3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона, химическая структура которых установлена с применением методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрофотометрии, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Впервые разработаны и научно аргументированы методики качественного анализа БАВ в листьях, почках, коре многолетней дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методом тонкослойной хроматографии, дифференциальной УФ-спектрофотометрии. Для экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» предложен также способ качественного анализа методом ВЭЖХ.

Впервые разработаны, и научно обоснованы методики количественного анализа суммы флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого. По итогам проведенной работы был оформлен патент РФ «Количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» и получена справка на приоритет изобретения РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого».

Впервые было проведено исследование водно-спиртовых извлечений и спиртовых экстракционных препаратов на основе листьев, коры

(фармакопейной и многолетней) и почек дуба черешчатого с целью скрининга антимикробной активности, в результате которого была выявлена антимикробная активность в отношении клинически значимых патогенных штаммов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (клинический штамм). По итогам работы получена справка на приоритет изобретения РФ «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью».

Изучена диуретическая активность астрагалина – диагностически значимого вещества в листьях дуба черешчатого, обладающего кренинуретическим действием. Проведено исследование острой токсичности экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка», доказана безопасность ее дальнейшего применения в медицинской практике.

Для листьев дуба черешчатого разработаны нормируемые числовые показатели, которые были использованы при создании проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа» для включения в дальнейшем в ГФ РФ.

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

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, как и их достоверность, обусловлена использованием современных адекватных методов исследования при выполнении работы, существенным объемом экспериментальных данных, их непротиворечивостью с теоретическими положениями, тщательно выполненной статистической оценкой экспериментальных данных, осуществленной с использованием программ пакета MS Office в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания. Следует заметить, что диссертантом проведен большой объем экспериментальной работы.

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

Впервые выделен диагностически значимый флавоноид листьев дуба черешчатого – астрагалин, который может быть использован в качестве рабочего стандартного образца (РСО).

Впервые из листьев дуба черешчатого выделены 3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и моносахарид рамноза, а также

флавоноиды изковерцитрин, кверцитрин, афзелин и 3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона.

Впервые разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методами ТСХ-, ВЭЖХ и дифференциальной УФ-спектрофотометрии.

Для количественного анализа суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого предлагается использовать метод дифференциальной УФ-спектрофотометрии с использованием СО рутина при аналитической длины волны 412 нм. Подтверждена возможность использование астрагалина для анализа содержания флавоноидов в листьях дуба черешчатого при длине волны 406±2 нм. Для спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого предложено использовать СО цинарозида при аналитической длине волны 400±2 нм (значение удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%} = 334$).

Впервые выявлено наличие антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов на основе листьев, почек и коры дуба черешчатого в отношении некоторых клинически значимых штаммов микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. В ходе исследования аргументировано наличия антимикробной активности исследуемых морфологических органов сырья дуба черешчатого и обоснована возможность использования в фармацевтической практике экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» (экстрагент – 70% спирт этиловый).

Доказано наличие диуретической активности диагностически значимого БАВ астрагалина, выделенного из листьев дуба черешчатого, обладающего выраженным креатининуретическим действием. Для экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» подтверждено отсутствие острой токсичности.

Разработаны числовые показатели качества листьев дуба черешчатого, в том числе содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 0,30 %), для проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листья» для включения в ГФ РФ.

По итогам проведенной работы был получен патент РФ «Количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» и 2 справки на приоритет изобретения РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба

черешчатого» и «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью».

Результаты диссертационного исследования, используются при осуществлении учебного и научного процесса в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации, кафедре химии Института фармации, в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы», в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь», что подтверждается полученными актами о внедрении.

Таким образом, результаты проведенных Рябовым Николаем Анатольевичем исследований имеют несомненное научно-практическое значение, и могут быть использованы в научных исследованиях, учебном процессе, а также на фармацевтических предприятиях.

5. Оценка содержания диссертации

. Диссертационная работа изложена на 216 (с приложениями) страницах машинописного текста, включает 29 таблиц и 54 рисунков. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, четыре главы, с результатами исследований, выводы и заключение, список литературы, состоящий из 174 источника, 63 из которых – на иностранном языке, а также приложения.

Во введении содержится описание актуальности темы представленного исследования, цель, задачи, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях по теме исследования и апробации работы.

Глава 1 включает обзор опубликованных результатов фармакогностических исследований дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) отечественных и иностранных авторов, описаны данные, касающиеся ареала, химического состава, подходов к стандартизации коры дуба черешчатого, фармакологические свойства сырья и препаратов, применяемых в медицинской практике.

Глава 2 включает описание объектов и методов исследования.

Объектами диссертационной работы являлись образцы листьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), дуба скального – *Q. petraea* Liebl.; дуба красного – *Q. rubra* L.; дуба летнего фастигиата – *Q. robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; дуба монгольского – *Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb.; дуба крупноплодного – *Q. macrocarpa* Michaux и дуба Мюлленберга – *Q.*

Muehlenbergii Engelm., культивируемые на территории Самарской области. Образцы сырья заготавливались с 2019 по 2021 гг.

Глава 3 посвящена результатам исследования морфолого-анатомического строения листьев и почек дуба черешчатого с использованием люминесцентного метода, приводятся данные сравнительного исследования петиолярной анатомии дуба черешчатого и его близкородственных видов, произрастающих на территории Самарской области.

В главе 4 приведены результаты выделения индивидуальных соединений из листьев дуба черешчатого, химическое строение и структура.

Глава 5 посвящена разработке методик качественного и количественного анализа листьев и почек дуба черешчатого с использованием ТСХ и УФ-спектрофотометрии, результаты исследования экстракционного препарата настойки листьев дуба и индивидуальных веществ методом ВЭЖХ анализа. Приведены результаты исследования по определению динамики накопления (биоаккумуляции) суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого, рекомендуемые числовые показатели сырья, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа».

Глава 6 содержит результаты скринингового исследования антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и спиртовых настоек листьев, почек и коры дуба черешчатого, результаты исследования диуретической активности астрагалина, данные по изучению острой токсичности спиртовой настойки листьев дуба черешчатого.

Диссертационная работа завершается выводами, заключением, практическими рекомендациями, описанием перспектив дальнейших исследований и списком литературы.

В приложениях к диссертации приведены акты внедрения (Приложение № 1); патенты РФ: «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» (№ 2751189, заявка № 2020133909; дата регистрации 12.07.2021); приоритетная справка на изобретение РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого» (заявка № 2021131121; дата поступления 25.10.2021; W21066025); приоритетная справка на изобретение РФ «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью» (заявка № 2021131123; дата поступления 25.10.2021; W21066027) (см. Приложения № 2). В приложении к диссертации приведена сравнительная таблица исследования морфологических признаков листьев рода *Quercus* (Приложение № 3); данные по фитохимическому исследованию листьев перспективных видов рода *Quercus* (Приложение № 4); таблицы

результатов изучения антимикробной активности ЛРС дуба черешчатого (Приложение № 5). В приложении № 6 представлены проекты ФС на новые виды ЛРС «Дуба черешчатого листа» и «Дуба черешчатого почки», гербарные образцы видов дуба, сырье которых было использовано в процессе выполнения диссертационного исследования.

6. Апробация работы.

Результаты диссертационного исследования были доложены на международных, Всероссийских и областных конференциях: Международной научно-практической конференции «90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 10–11 июня 2021 г); Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 13-16 сентября 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 17–18 декабря 2020 г); Международной научно-практической конференции «От растения до лекарственного препарата» (г. Москва, 04–05 июня 2020 г); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (г. Витебск, 12–13 мая 2020 г); Аспирантские чтения – 2020: научные исследования и инновации (г. Самара, 15 октября 2020 г); Современные проблемы фармакогнозии (г. Самара, 28 октября 2019 г); Молодые ученые: научные исследования и инновации (г. Самара, 10 октября 2019 г); XII Всероссийская (86-я итоговая) студенческая научная конференция с международным участием "Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты" (г. Самара, 11 апреля 2018 г); II Межвузовская научно-практическая конференция "Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы" (г. Самара, 07 октября 2017 г); V научно-практическая конференция студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера "Нижеволжский" "Физика и медицина: создавая будущее" (г. Самара, 10 декабря 2021 г); Аспирантские чтения - 2021: Молодые ученые – медицине (Самара, 13–14 октября 2021 г.); Всероссийская Научно-практическая Онлайн-конференция с международным участием "Фармацевтическое образование СамГМУ. история, современность, перспективы", посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (Самара, 26–27 октября 2021 г.).

7. Публикации.

Наиболее значимые материалы диссертационного исследования опубликованы в 18 печатных работах, из них 6 статей в журналах,

рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них 2 статьи в журналах, входящих в международные базы цитирования Scopus и WoS. Получен 1 патент Российской Федерации и 2 справки на приоритет изобретения РФ.

Представленную работу отличают целостность проведенных исследований, последовательность и логичность изложенного материала. Диссертационная работа оформлена в соответствии с современными требованиями, материал хорошо и последовательно изложен.

Однако, несмотря на общую положительную оценку, по диссертационной работе Рябова Николая Анатольевича возник ряд вопросов и замечаний.

Вопросы и замечания:

1. Учитывали ли Вы рациональную эксплуатацию зарослей при заготовке почек, как повлияет заготовка на дальнейшее развитие растения?
2. Вы указали, что в качестве объектов исследования заготавливали почки вегетативные и генеративные, как их исследовали, по отдельности или готовили смешанный образец?
3. Каково их процентное соотношение, есть ли отличие в составе БАВ этих видов почек?
4. В поставленных задачах нет разработки ФС на ЛРС «почки», только ФС «листья».
5. Учитывалась ли антимикробная активность экстрагента, при определении антимикробной активности настойки?
6. А при определении токсичности?
7. Вы указываете, что ввиду отсутствия стандартного образца астрагалина использовали рутин, но на хроматограммах, рис.22 и 23 точки обозначены как СО астрагалина? Может не СО, а РО?
8. Рис. 39, рис.40, 41 - пояснения в тексте не соответствуют обозначениям на рисунках.

В диссертации встречаются опечатки, неудачные выражения, повторы (стр.27,46,47,51,126,

В то же время указанные замечания и вопросы могут быть расценены, скорее, как дискуссионные, не имеющие принципиального характера и не снижающие ценности диссертационной работы.

8. *Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации*

Диссертация Рябова Н.А. соответствует паспорту специальности 3.4.2— Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а содержание автореферата полностью соответствует основным положениям и выводам диссертационной работы.

9. Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»

Таким образом, диссертационная работа Рябова Николая Анатольевича на тему: « Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2— Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научно- квалификационной работой, в которой содержится решение научной проблемы современной фармакогнозии и фармацевтической химии по изучению, оценки качества и стандартизации новых видов сырья и фитопрепаратов из них фармакопейных растений.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Рябова Николая Анатольевича соответствует требованиям п.14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 20.03.2021 № 426), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2— Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Заведующая кафедрой фармакогнозии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, 2
(342) 238-43-38, (342) 238-43-38,
e-mail: belonogova@pfa.ru
доктор фармацевтических наук;
профессор; 15.00.02 – фармацевтическая
химия и фармакогнозия

Бел Белоногова Валентина Дмитриевна

« 22 » апреля 2022 г.



22.04.2022

С отзвон ознакоми 05.05.22 9
Рябов