

ОТЗЫВ

заведующего кафедрой фармацевтического анализа федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации»,

доктора фармацевтических наук Белоусова Михаила Валерьевича по диссертации Зименкиной Натальи Игоревны на тему: «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans* L.)», представленной на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук по специальности

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

1. Актуальность выполненного исследования

Одним из приоритетных направлений развития современной фармацевтической промышленности Российской Федерации в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 29.12.2021 № 2544 «О внесении изменений в государственную программу Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» является импортонезависимость субстанций и лекарственных средств в целях обеспечения лекарственной безопасности Российской Федерации. Следовательно, создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов (ЛП), в том числе изготовленных на основе растительного сырья (РС), является актуальным направлением научных изысканий. С этим связаны такие важные этапы исследований, как изучение лекарственных растений, выделение и идентификация биологических активных соединений (БАС) из лекарственного растительного сырья (ЛРС), что необходимо для разработки объективных и унифицированных методик определения доброкачественности самого сырья и лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на его основе.

Современное состояние фармацевтической науки в области фармакогнозии характеризуется определенным исчерпанием потенциала исследований широко известных официальных лекарственных растений. В

Листов	Вкл. №	28
11	05	2022
"Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации		
Тел./факс: 8 (846) 333-29-76		

рамках поиска новых перспективных источников БАС природного происхождения целесообразным является исследование малоизученных видов растительного сырья. К данной группе растений можно отнести представляющие интерес для изучения виды рода Орех (*Juglans* L.): орех грецкий (*Juglans regia* L.), орех черный (*Juglans nigra* L.) и орех серый (*Juglans cinerea* L.). Представителя рода *Juglans* L. известны благодаря наличию в своем составе биологически активных соединений (БАС) – нафтохинонов, обуславливающих высокую антибактериальную, противогрибковую и противовоспалительную активность. Наряду с указанной группой БАС растения содержат и другие компоненты, в том числе и флавоноиды. В настоящее время для представителей рода Орех отсутствует нормативная документация, регламентирующая его качество, как в нашей стране, так и за рубежом. В имеющихся научных данных по вопросам контроля качества указанных видов растительного сырья, существует подход к стандартизации видов рода Орех по группе БАС – нафтохинонам. Однако, в целях более объективной стандартизации следует учитывать высокое содержание флавоноидов в видах рода *Juglans* L., что позволяет предположить их весомый вклад в фармакологическую активность растений. Отсюда следует, что фармакогностическое исследование растительного сырья видов рода Орех с целью разработки унифицированных подходов к оценке доброкачественности и научного обоснования целесообразности дальнейшего использования в медицинской и фармацевтической практике как нового вида растительного сырья достаточно перспективно.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что диссертационная работа Зименкиной Н.И. направлена на решение актуальных задач фармакогностического и фармацевтического анализа и заключается в экспериментально-аналитической работе по углубленному изучению химического состава видов сырья рода Орех, расширению ассортимента отечественных ЛРП, решению вопросов разработки объективных и

унифицированных подходов к стандартизации сырья и препаратов на его основе.

2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

В ходе проведенного сравнительного фитохимического исследования коры, листьев и околоплодников ореха черного (*Juglans nigra* L.), ореха грецкого (*Juglans regia* L.), ореха серого (*Juglans cinerea* L.) установлен наиболее перспективный вид растительного сырья, содержащий флавоноиды – орех черный (*Juglans nigra* L.). Диссертантом выделено из коры ореха черного 5 индивидуальных соединений. Впервые выделены БАС, идентифицированные как мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоны), его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоны), сакуранин (сакуранетин-5-О- β -D-глюкопиранозид; 5-О- β -D-глюкопиранозид 5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванона) и его агликон сакуранетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон). Кроме того, из коры ореха черного выделен юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон).

Проведенное хроматографическое исследование листьев ореха черного позволило выделить и установить структуру 5 индивидуальных БАС. Впервые выделен этоксиюглон (2-этокси-5-гидрокси-1,4-нафтохинон). Также в листьях ореха черного по данным проведенных исследований содержатся кверцитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-гексагидроксифлавоны) и его агликон кверцетин (5,4'-дигидроски-7-метоксифлаванон), мирицитрин (3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоны) и его агликон мирицетин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксифлавоны). Проведен анализ с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) компонентного состава коры и листьев ореха черного. Установлено, что мирицитрин является диагностически значимым соединением коры и листьев ореха черного.

Разработан унифицированный подход к контролю качества коры и листьев ореха черного, основанный на определении диагностически

значимых соединений группы БАС – флавоноидов – методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), ВЭЖХ и спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра.

Для контроля содержания БАС диссертант предлагает использовать разработанные методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на мирицитрин в коре и листьях ореха черного в условиях дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 416 нм. Кроме того, показана возможность использования метода ВЭЖХ для количественного определения содержания мирицитрина и кверцитрина в коре и листьях ореха черного. Разработанные методики включены в проекты фармакопейной статьи на новые виды растительного сырья – «Ореха черного кора» и «Ореха черного листья».

В рамках диссертационной работы Зименкиной Н.И. проведено морфолого-анатомическое исследование коры и листьев ореха черного методом люминесцентной микроскопии. Предложен способ получения лекарственных препаратов «Ореха черного коры настойка», «Ореха черного листьев настойка», а также методики контроля качества разработанных лекарственных препаратов по содержанию флавоноидов методами ТСХ, спектрофотометрии и ВЭЖХ. Проведена предварительная оценка фармакологической активности указанных видов сырья.

При выполнении диссертационного исследования использовались микроскопические методы (цифровая и люминесцентная микроскопия); современные инструментальные методы анализа: хроматографические (хроматография в тонком слое сорбента, жидкостно-адсорбционная колоночная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография); спектральные и фотометрические методы: спектрофотометрия в УФ и видимой областях, ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия), химические, технологические и фармакологические методы. Статистическая обработка результатов эксперимента осуществлена с использованием программного обеспечения в соответствии с

Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV издания).

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

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, базируется на существенном объеме непротиворечивых экспериментальных данных, их согласованности с теоретическими положениями, современных методах исследования, адекватной статистической обработке данных, осуществленной с использованием с использованием программ STATISTICA 10.0 (Statsoft Inc., USA) и ChemMetr 1.0 и в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

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

Результаты проведенных исследований позволяют осуществлять контроль качества новых видов растительного сырья и препаратов на их основе широко используемыми в фармакогностическом анализе физико-химическими методами анализа.

Научно-практическая значимость полученных методик определения основных групп БАС подтверждается патентом Российской Федерации № 2747417 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного» (заявка № 2020129429, от 04.09.2020 г., решение о выдаче патента 04.05.2021 г.), патентом Российской Федерации № 2747482 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях ореха грецкого» (заявка № 2020129431, от 04.09.2020 г., решение о выдаче патента 05.05.2021 г.). Разработанные методики качественного и количественного анализа коры и листьев ореха черного включены в проекты фармакопейной статьи «Ореха черного кора» и «Ореха черного листа».

Важно также подчеркнуть, что полученные данные внедрены в производственный процесс ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы» и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика». Результаты проведенных исследований используются в учебном процессе на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, химии Института фармации, фармацевтической технологии с курсом биотехнологий и управления и экономики фармации Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Полученные диссертантом решения представляют интерес для совершенствования учебного процесса по курсу «Фармакогнозия» в медицинских и фармацевтических вузах, а также быть использованы при проведении научно-исследовательских работ по изучению лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды. Возможно внедрение результатов диссертационного исследования в работу центров контроля качества ЛС, а также в производственные процессы фармацевтических предприятий.

5. Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследования, 5 глав собственных исследований с выводами, заключения, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 109 отечественных и 75 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 таблицами и 57 рисунками.

Во введении обоснованы актуальность диссертационного исследования, установлены цели и задачи исследования, степени разработанности темы. Представлены данные о научной новизне и практической значимости, основных положениях, выносимых на защиту, а также сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 диссертации представляет собой обзор литературы российских и зарубежных научно-исследовательских работ в области

фармакогностического исследования представителей рода Орех (*Juglans* L.). В главе систематизированы сведения по таксономической характеристике, ботаническому описанию, ареалу распространения ореха грецкого, ореха черного и ореха серого, химическому составу, фармакологическим свойствам и областях применения указанных видов сырья, а также представлены современные подходы к стандартизации сырья.

В главе 2 описаны объекты и методы исследования, использованные в диссертационной работе.

Глава 3 посвящена результатам сравнительного фитохимического исследования различных видов растительного сырья ореха черного, ореха грецкого и ореха серого. В главе также описывается процесс изучения химического состава растительного сырья коры и листьев ореха черного: выделение, очистка и определение структуры индивидуальных биологически активных соединений.

В главе 4 изложены результаты обоснования подходов к стандартизации сырья ореха черного. Указанные подходы подкреплены представленными методиками качественной и количественной оценки качества сырья, а также рекомендуемыми числовыми показателями минимального содержания БАС в коре и листьях ореха черного.

Глава 5 посвящена результатам собственных морфолого-анатомических исследований коры и листьев ореха черного с использованием метода люминесцентной микроскопии.

Глава 6 содержит результаты исследований по получению и разработке методов стандартизации настоек коры и листьев ореха черного.

Глава 7 включает результаты прогноза фармакологической активности индивидуальных соединений исследуемых видов сырья, и последующий анализ определенного фармакологического действия данных соединений.

В приложения вынесены ЯМР- и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из коры и листьев ореха черного, акты внедрения, патенты «Способ количественного определения суммы флавоноидов в коре ореха черного» и «Способ количественного определения суммы флавоноидов

в листьях ореха грецкого», а также проекты фармакопейной статьи «Ореха черного кора» и «Ореха черного листа».

По теме диссертации опубликованы 23 печатные работы, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 4 работы, входящих в международные базы цитирования SCOPUS. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Результаты диссертационной работы используются в практической работе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы», ООО «Лекарь» и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», а также в учебном процессе на кафедрах Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Кроме того, полученные автором результаты можно использовать в учебном процессе профильных кафедр медицинских и фармацевтических высших учебных заведений, а также в рабочем процессе фармацевтических предприятий.

Несмотря на общую положительную оценку по диссертационной работе Зименкиной Н.И. возникли некоторые вопросы и замечания:

1. По какой причине в качестве объекта исследования автором выбраны листья и кора только ореха черного, исключив из исследования другие филогенетически близкие виды рода орех?

2. В диссертации представлены проекты ФС на два вида сырья. При этом, изучение динамики накопления БАС не проводили для сырья «Ореха черного кора», ограничившись подобным исследованием только для листьев? Почему?

3. При количественном определении суммы флавоноидов автор осуществляет пересчет на мирицитрин? В то же время на спектрах поглощения в условиях дифференциальной спектрофотометрии максимум поглощения извлечения листьев ореха черного и максимум поглощения

стандартного образца мирицитрина различаются. Чем можно объяснить выбор стандартного образца?

4. При разработке подходов к стандартизации сырья листьев и коры ореха черного автор использовал сырьё из одного места культивирования: ботанического сада Самарского государственного университета? Является ли это достаточным для получения репрезентативных данных, учитывая почвенные и другие факторы, в т.ч. эколого-генетические?

5. В каком виде проводили введение субстанции мирицитрина экспериментальным животным при исследовании нейротропной активности, учитывая, что в воде очищенной, как представлено в диссертации, он мало растворим?

6. Чем обусловлен выбор диапазона доз от 0,5 до 5 мг/кг при проведении фармакологических исследований? На основании чего он был установлен при планировании эксперимента?

7. Как Вы можете объяснить первоначальное увеличение двигательной активности у крыс при дозе 0,5 мг/кг и значительное её снижение при дозе 5 мг/кг при исследовании нейротропной активности?

8. Почему при исследовании острой токсичности препаратов черного ореха: настойки листьев и настойки коры была выбрана лишь одна доза - 500 мг/кг? Является ли это, по мнению автора, достаточным и корректным верхним пределом при определении класса опасности по ГОСТ 12.1.007 - 76, учитывая, что летальности животных и изменений в их поведении в эксперименте при дозе 500 мг/кг не отмечено.

9. Одна из задач исследования диссертанта «разработка проекта фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья - «Ореха черного листа». Следует пояснить новизну данного растительного источника, т.к. ранее в работе Дайронас Жанны Владимировны «Экспериментально-теоретическое исследование лекарственного растительного сырья, содержащего нафтохиноны, и его стандартизация» был представлен проект фармакопейной статьи «Ореха черного листа».

10. При разработке фармакопейных статей автором определены нормы содержания суммы флавоноидов и отдельных БАС в сырье коры и листьев ореха черного. Сколько образцов указанных видов сырья использовалось в данном эксперименте и насколько объективно они могут представлять варьирование этих показателей в зависимости от климатических условий года, возраста растений, объема сырьевой части растения?

Однако указанные замечания и вопросы не носят принципиального характера, являются дискуссионными или уточняющими и не снижают ценности диссертационной работы.

6. Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные положения и выводы диссертационной работы Зименкиной Натальи Игоревны.

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

Таким образом, диссертационная работа Зименкиной Натальи Игоревны на тему: «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans* 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 важной научной задачи современной фармацевтической химии и фармакогнозии по изучению и разработке подходов к стандартизации новых видов растительного сырья, в частности коры и листьев ореха черного, а также соответствующих препаратов, выделению биологически активных соединений из изучаемых видов сырья.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Зименкиной

Натальи Игоревны соответствует требованиям п. 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. постановления Правительства РФ от 20.03.2021 г. № 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:

Заведующий кафедрой фармацевтического
анализа федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации»,
634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2
Телефон: +7 (382) 290-11-01 доб. 1927
E-mail: mvb63@mail.ru
доктор фармацевтических наук
(15.00.02 – фармацевтическая химия,
фармакогнозия,
14.00.25 – фармакология, клиническая
фармакология)



Белоусов Михаил Валерьевич



С отзывом ознакомлена 11.05.2022

