

## ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора *Шмыгаревой Анны Анатольевны* по диссертации *Шамилова Арнольда Алексеевича соискателя* на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. как потенциальных источников фенольных соединений и перспективы их использования в фармации», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

### 1. Актуальность выполненного исследования

Диссертационная работа Шамилова А.А. выполнена в рамках актуальных государственных программ в области фармации, связанной со стратегией фармацевтической отрасли в Российской Федерации, запланированной до 2030 г.

Автором отмечено, что в течение последних 15-20 лет фармакогнозия получила новые научные данные в области изучения химического состава лекарственных растений. Прогресс в этой сфере обусловлен использованием современных спектральных и физико-химических методов исследования. Применение спектроскопии  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, масс-спектрометрии позволило ученым изучить структуру различных биологически активных веществ. Внедрение методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) расширило возможности для стандартизации лекарственных растений и фитопрепаратов, что нашло отражение в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания.

При большом перечне инструментальных методов еще одной из возникающих проблем является выбор правильных подходов к стандартизации ЛРС. Возможным решением является комбинация физических, физико-химических, химических и биологических методов анализа (цифровая микроскопия, ультрафиолетовая спектрофотометрия, ТСХ, ВЭЖХ, газовая хроматография (ГХ), инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия), ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) и масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез (КЭ), генетические исследования и другие. При использовании всех современных инструментальных методов необходимо научно обосновывать выбор одного из них и предлагать его в качестве метода и методики стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС).

10	№ 1230/02-23-132
ЛСТОВ	07 10 20 24
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации	
тел./факс +7(846) 374-10-03	

По мнению автора, неотъемлемыми компонентами растений являются фенольные соединения, полисахариды, белки и т.д. Так, из 107 ФС – 39 (36,4 %) включают стандартизацию по содержанию флавоноидов, 9 (8,4 %) – по содержанию дубильных веществ, 6 (5,6 %) – по содержанию антраценпроизводных, 4 (3,7 %) – по содержанию лигнанов, 3 по – содержанию фенологликозидов, 3 (2,8 %) – по содержанию фенолокислот, 2 (2,8 %) – по содержанию фенилпропаноидов, 1 (1,4 %) – по содержанию кумаринов. Всего по фенольным соединениям 67 статей из 107, что в процентной соотношении составляет 62,6 %. Видно, что значительный удельный вес видов ЛРС анализируется по содержанию фенольных соединений, среди которых основную часть составляют флавоноиды.

Актуальным в диссертационной работе Шаилова А.А. является разработка методологического подхода к стандартизации фармакопейных и нефармакопейных видов ЛРС (на примере видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.), содержащего преимущественно фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы), с последовательным применением современных инструментальных возможностей, а также обосновать объективные показатели качества лекарственного сырья, содержащих данную группу БАС.

В связи с изложенным, диссертационная работа Шаилова Арнольда Алексеевича, посвященная разработке методологического подхода к стандартизации растений содержащих преимущественно фенольные соединения, является актуальной.

## **2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность**

Научная новизна диссертационной работы Шаилова А.А. состоит в следующем:

1. Впервые с использованием стерео- и люминесцентного микроскопического метода анализа, были установлены показатели подлинности для сырья некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Установлена люминесцентная характеристика листовой пластинке, трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомические признаки черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, дополнительно для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян. Установленные диагностические признаки были внесены в проекты ФС.

2. Впервые для сырья некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., и *Vaccinium* L. и *Prunella* L. разработан и предложен метод ТСХ как один из разделов ГФ РФ на ЛРС «Определение основных групп биологически активных веществ», предусматривающий в качестве стандартного образца диагностическое, доминирующий по содержанию в смеси фенольных соединений компонент. Впервые для вышеперечисленных видов предпринята попытка использования метода секвенирования генома как

альтернативного метода, с помощью которого были установлены внутривидовые участки ДНК.

3. Впервые для некоторых видов *Arctostaphylos* Adans., и *Vaccinium* L. и *Prunella* L. предложены схемы выделения фенольных соединений с использованием известных и современных методов анализа. Впервые для некоторых видов ЛРС определен полисахаридный комплекс с детальным установлением их компонентного состава и определением физико-химических констант (средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность, сорбционная способность). Впервые для некоторых видов установлен белковый и элементный состав. Все образцы, заготовленные во флоре Северного Кавказа, впервые подверглись детальному фитохимическому анализу с использованием современных, высокоточных приборов применяемых в аналитической химии.

4. Из листьев брусники обыкновенной с помощью предложенной схемы выделения выделено 27 соединений, 3 из которых являются новыми – 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (вакцинизид А), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (вакцинизид В) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3''''-гидрокси-3''''-метилглутароил)}- $\alpha$ -L-рамнопиранозид. Из побегов данного растения выделено 17 соединений, 3 из которых являются новыми: катехин-О-гликозидами, (-)-эпикатехин-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (вакцинизид D), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (вакцинизид E) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (вакцинизид F). Впервые с помощью предложенной схемы выделения из травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной, заготовленной во флоре Северного Кавказа, было изолировано 18 соединений, 1 из которых является новым - кверцетин-3-О-(4''-ксилозил-6''-рамнозил)-глюкозид.

5. Впервые для некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. были разработаны, валидированы и предложены методики суммарного содержания фенологликозидов, фенолокислот и флавоноидов (УФ- спектроскопия) в пересчете на основную по содержанию компонент в смеси фенольных соединений. С использованием метода капиллярного электрофореза разработаны, валидированы и предложены методики определения основных по содержанию компонентов (арбутин, хлорогеновая и розмариновая кислоты) в смеси фенольных соединений.

6. Впервые для некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. (исключение - толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья) установлены режимы сушки, показатели качества сырья и сроки годности.

7. Взамен титриметрического метода анализа применимого для количественного определения арбутина в толокнянке обыкновенной и бруснике обыкновенной листьях впервые для внесения в ФС ГФ РФ XIV предложена спектрофотометрическая методика. Впервые разработаны

проекты ФС на новые виды сырья «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки трава».

8. Проведенный первичный скрининг извлечений полученных из некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. с использованием различных экстрагентов, таких как вода очищенная, спирт этиловый 40%, спирт этиловый 70% и спирт этиловый 96%. Позволил сделать вывод, что извлечения из вышеперечисленных образцов обладают поливалентным профилем активности, напрямую зависящий от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

9. Научная новизна исследования подтверждена патентом РФ на изобретение № 2794752 (от 24.04.2023) «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Полученные результаты в ходе экспериментальной работы Шамилова А.А., сформулированные выводы и практические рекомендации базируются на достаточном объеме выполненных исследований, реализованных на оборудовании, которое имеет соответствующие сертификаты и свидетельства о поверке. Достоверность результатов подтверждена соответствующими графиками, таблицами и рисунками. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны, согласно требованиям действующей нормативной документации с использованием программы «Microsoft Excel 2016». Проанализирован значительный объем литературных источников как отечественных, так и на иностранных языках, а также ФС из ГФ РФ и других стран.

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

Обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, основана на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, корректностью обработки информации, использованием актуальных и проверенных источников информации. Научные положения и выводы, сформулированные в работе, являются обоснованными, достоверными и логически вытекают из поставленных задач.

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

На основании полученных автором экспериментальных данных разработан методологический подход к исследованию лекарственного растительного сырья, содержащего в качестве ведущей группы БАС фенольные соединения. Представленный алгоритм позволяет рационально и обоснованно подходить к выбору критериев определения подлинности ЛРС с использованием современных методов установления совокупности диагностических признаков.

На этапе детального фитохимического исследования автор предлагает использование сепарационных методов анализа в сочетании с передовыми методами позволит выделять химические вещества и устанавливать структуру новых соединений (методом масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии) и идентифицировать доминирующие или диагностически значимые соединения. Расшифрованный химический профиль позволит объективно подойти к выбору методов анализа на этапе определения основных групп биологических активных веществ (методом ТСХ), суммарного содержания фенолокислот, фенологликозидов, флавоноидов, фенилпропаноидов (методом СФ), а также доминирующих компонентов (методом ВЭЖХ или КЭ).

При фитохимическом исследовании автором установлена необходимость определения биополимеров (полисахаридов и белков), их монокомпонентов; физико-химических констант, а также элементного состава обязательных компонентов экстракционных лекарственных форм.

На этапе фармакологического скрининга рекомендуется учитывать количественный и качественный состав ведущей группы БАС, биополимеров, макро- и микроэлементов, что позволит рационально и обоснованно подходить к определению видов биологической активности планируемых лекарственных форм.

Полученные автором результаты диссертации, практические рекомендации, затрагивающие вопросы оценки подлинности (внешние признаки, микроскопия, определение основных групп биологически активных веществ) и качества ЛРС (раздел «испытания»), предлагаются для внедрения в практическую работу Федеральных и региональных Центров сертификации и контроля качества лекарственных средств; для внедрения на фармацевтические предприятия и организации, занимающихся серийным выпуском лекарственных средств растительного происхождения, научно-исследовательской работой в области фармакогнозии и фармацевтического анализа.

Автором разработан алгоритм исследования растений содержащих преимущественно фенольные соединения, который представлен в виде алгоритма. Перспективным аспектом разработанного и обоснованного методологического подхода заключающегося в установлении критериев и разработке алгоритмов выбора методов для определения показателей подлинности ЛРС, в том числе для близкородственных видов, установлении ведущей группы БАС, которая является обоснованной основой для разработки показателей качества ЛРС, а также для прогнозирования фармакологической активности планируемой лекарственной формы, используя модель, описанную в представленном алгоритме.

Теоретические положения, сформулированные в диссертационной работе Шамилова А.А. целесообразно использовать в учебном процессе медицинских и фармацевтических высших учебных заведений на территории Российской Федерации по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия». Результаты диссертационного исследования

внедрены в учебный и научный процесс федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», а также на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

## 5. Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, 7 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 159 отечественных и 299 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 167 таблицами и 109 рисунками. Приложение изложено на 208 страницах печатного текста, проиллюстрировано 184 рисунками, содержит 37 таблиц.

Каждая глава представляет собой завершённый этап исследования, выводы отражают значимые теоретические и практические результаты.

Во **введении** Шамилов А.А. обосновал актуальность выбранной темы диссертационной работы, определил цели и сформулировал задачи исследования, отразил научную новизну и практическую значимость исследования, а также обозначил основные положения, которые будут выдвинуты на защиту. Введение также включает описание методологии и методов исследования, информацию о публикациях и апробации работы.

В **главе 1** проведен обзор литературы, в котором приведены данные отечественных и зарубежных авторов, отражающие современное состояние изученности представителей родов *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная, толокнянка кавказская), *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, голубика обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, клюква болотная) и *Prunella* L. (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная). В обзоре также приведена ботанико-таксономическая характеристика видов представленных родов, их химический состав, методы анализа БАС и фармакологическая активность. На основании данных представленных в главе 1 Шамиловым А.А. предложены критерии и обоснован выбор растительных объектов, а также определены комплексного экспериментального исследования.

В **главе 2** содержится информация об объектах исследования, использованных методах исследования, оборудовании и реактивах использованных при выполнении диссертационной работы. В таблице приведена таблица с характеристикой объектов исследования, указаны места и время заготовки. Приведены схемы выделения индивидуальных веществ. Описаны методики и условия доклинических испытаний сухих экстрактов используемых при фармакологическом скрининге.

В **главе 3** представлены исследования по установлению показателей подлинности макро- и микроскопическими методами анализа с использованием стерео- и люминесцентной микроскопии, а также представлены данные, полученные в результате ДНК-штрихкодирования исследуемых образцов. Для раздела «Определение основных групп

биологически активных веществ» разработаны методики на основе ТСХ по основному содержанию в смеси фенольных соединений компоненту.

В главе 4 содержатся результаты фитохимического исследования ЛРС, в которой отражен компонентный состав основной группы БАС – фенольные соединения. Автором детально описано выделение 59 индивидуальных веществ 7, из которых являются новыми и ранее не описанными в литературе. Большое внимание уделяется интерпретации ЯМР – спектров новых, выделенных соединений. Для каждого исследуемого объекта определен доминирующий компонент в сумме фенольных соединений.

В главе 5 представлены результаты исследования биополимеров (полисахаридов и белков), как естественных БАС экстракционных лекарственных форм, а также сведения об их компонентном составе, физико-химических константах (полисахаридов), которые как считает автор имеют важное значение при разработке лекарственной формы. Также в главе представлены сведения о качественном и количественном содержании минерального состава исследуемых объектов.

В главе 6 представлены разработанные автором методики количественного анализа по сумме веществ (фенологликозиды, флавоноиды и фенилпропаноиды) в пересчете на доминирующий компонент. Для основного компонента разработана (для каждого анализируемого объекта) был предложен сепарационный методом – капиллярный электрофорез (полученные результаты подтверждены методом ВЭЖХ). Для всех разработанных методик были определены валидационные параметры, рекомендуемые ГФ РФ XIV издания.

В главе 7 для каждого анализируемого объекта представлены числовые показатели как обязательные нормы качества для внесения в проект ФС, сроки годности и режимы консервации (сушки) анализируемых образцов. В данной главе автором рассмотрены различные виду сушки, такие как естественная (воздушно-теневая) и искусственная: конвективная сушка при температурах 40 °С, 50°С, 60 °С и 70 °С, инфракрасная сушка при температурах 40 °С, 50°С, 60 °С и 70 °С. Также установлены сроки хранения для каждого анализируемого объекта и нормы качества: влажность; зола общая; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте; пределы для показателя «измельченность» и посторонних примесей.

В главе 8 представлены фармакологические исследования. Приведены исследования по определению острой токсичности, диуретической, антиоксидантной, нейропротекторной, антитиразиновой и актопротекторной видов активности сухих экстрактов полученных путем экстракции водой очищенной, спиртом этиловым 40 %, 70 % и 95 %.

В главе 9 автором обобщены полученные результаты по всем главам, в результате была представлена методология в виде схемы. Методология представлена в виде алгоритма с кратким описанием этапов анализа лекарственных растений и их сырья, содержащих преимущественно фенольные соединения.

**В приложениях** представлены ареалы произрастания и описание производящих растений, фотографии гербарных образцов и ЛРС, микрофотографии исследуемых объектов, ВЭЖХ хроматограммы, электрофореграммы, графические диаграммы, таблицы с расчетами, спектральные характеристики ЯМР-, <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C- выделенных соединений. В приложении 8 представлены акт внедрения на проекты ФС (компания «Марьин Луг» ИП Повышева), инструкции по сбору и сушке ЛРС (утвержденные в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН), акты о внедрении результатов научной и инновационной деятельности в ФГБОУ «Воронежский государственный университет» и на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО». Подтверждение от ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России о соавторстве в разработке Фармакопейных статей ФС.2.5.0063.18 «Брусники обыкновенной листья» и ФС.02.5.0099.18 «Толокнянки обыкновенной листья».

По теме диссертации опубликовано 21 работ, 21 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, оформлен 1 патент.

Данные диссертации Шаилова А.А. нашли отражения в практической работе провизоров и фармацевтов, результаты исследования вошли в ГФ РФ XIV издания в виде двух ФС на «Толокнянки обыкновенной листья» и «Брусники обыкновенной листья». Также установленные нормы качества, вошли в проекты ФС на «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы» (внедренные в компании «Марьин Луг» ИП Повышева). На все вышеперечисленные виды ЛРС разработаны инструкции по сбору и сушки, которые утверждены в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН).

Результаты диссертационного исследования находят применение в учебной работе, используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», а также для входного контроля качества ЛРС на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

#### **Вопросы и замечания:**

1. На хроматограммах представленных в главе 4 (рисунок 4.1, 4.2, 4.3) пики анализируемых веществ не разделились, каким образом Вы рассчитывали количественное содержание отдельных соединений (таблица 4.2, 4.4)?
2. В третьей главе широко представлены морфологические признаки анализируемых видов лекарственного растительного сырья со сводными отличительными таблицами, что отсутствует для микроскопических признаков, а также у большей части картинок с микроскопией нет обозначений анатомо-гистологических признаков.

3. Почему при использовании метода ТСХ Вы не анализируете новые соединения, впервые выделенные из данного лекарственного растительного сырья?
4. Каким образом осуществляли подбор условий экстрагирования при разработке методики количественного определения методом спектрофотометрии для толокнянки обыкновенной листья и толокнянки кавказской листья?
5. Почему в приложении к диссертации не представлены проекты впервые вводимых фармакопейных статей, лишь первая страница?
6. При анализе хроматографической подвижности (таблица 4.3, 4.5, 4.7) Вы использовали в качестве веществ сравнения стандартные образцы, выделенные в ходе исследований? В данных таблицах Вы также ссылаетесь на литературные данные, однако не приводите никаких ссылок?
7. Какие базы данных Вы использовали для подтверждения новизны впервые открытых Вами соединений?
8. Анализ минерального состава вы проводили в сырье, осуществлялся ли анализ минерального состава экстрактов из лекарственного растительного сырья?
9. Вами предложены проекты ФС на сырье «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги», «Черноголовки трава», проводились ли Вами исследования ресурсоведческого характера?
10. В диссертационной работе имеются отдельные опечатки и стилистические погрешности.

Необходимо отметить при этом, что сделанные замечания носят рекомендательный характер, не влияют на положительную оценку диссертационной работы Шаилова А.А.

## **6 Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Содержание автореферата Шаилова А.А. полностью соответствует основным положениям и выводам диссертации. Диссертационная работа Шаилова Арнольда Алексеевича соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

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

Таким образом, диссертационная работа *Шаилова Арнольда Алексеевича соискателя* на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. как потенциальных источников фенольных соединений и перспективы их использования в фармации», представленная на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится

решение важной научной проблемы современной фармацевтической химии и фармакогнозии связанной с разработкой новых подходов к стандартизации растительного сырья содержащего фенольные соединения, а также перспективами использования суммарных экстрактов в качестве лекарственных средств с поливалентным фармакологическим действием.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа *Шамилова Арнольда Алексеевича* соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 25.01.2024 г. № 62), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

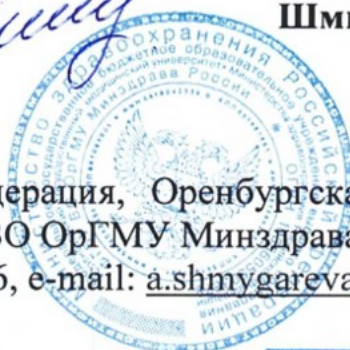
### Официальный оппонент

Заведующий кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия), профессор

**Шмыгарева Анна Анатольевна**

30.09.2024

460000, Российская Федерация, Оренбургская область, г. Оренбург, ул. Советская. д. 6, ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России  
Телефон: 8(3532) 50-06-06, e-mail: [a.shmygareva@mail.ru](mailto:a.shmygareva@mail.ru)



С отзывом ознакомлен 07.10.2024 Шамилов