

## ОТЗЫВ

официального оппонента доцента кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, доцента **Браславского Валерия Борисовича** по диссертации **Шамилова Арнольда Алексеевича** 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 учёной степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

### 1. Актуальность выполненного исследования

Актуальность диссертационного исследования Арнольда Алексеевича Шамилова несомненна и обусловлена решением современной комплексной проблемы качественного, безопасного и эффективного лекарственного обеспечения населения нашей страны в рамках Стратегии национальной безопасности Российской Федерации. Одной из важнейших задач отечественного здравоохранения по решению этой проблемы является разработка и совершенствование современных подходов к стандартизации лекарственных растительных средств. Среди лекарственных средств растительного происхождения наибольший интерес представляют виды лекарственного растительного сырья (ЛРС), содержащие биологически активные соединения (БАС) фенольной природы. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания из 107 фармакопейных статей (ФС) на виды ЛРС почти в 70 % из них требуется оценка подтверждения подлинности и качества именно по фенольным соединениям. Известно, что природные фенольные соединения относятся к одним из наиболее распространённых вторичных метаболитов растений. Данные БАС чрезвычайно разнообразны по своей структуре и свойствам. В настоящее время уже известны более 10 тыс. соединений фенольной природы

14	№ 1230/02-23-134
листов	11 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	

растительного происхождения, и исследователи продолжают открывать всё новые вещества этого класса БАС. Это обусловлено современными методическими возможностями для выделения, очистки, разделения, идентификации уже известных и установления структуры новых природных соединений. Для этого используются различные физические, физико-химические и химические методы современного анализа: различные виды хроматографии, электрофореза, спектральные и другие.

В настоящее время в РФ активно продолжается работа учёных по разработке новой и совершенствованию существующей фармацевтической нормативной документации на лекарственное растительное сырьё, фармацевтические субстанции растительного происхождения и лекарственные препараты на основе этих субстанций. Разработанные и включённые в современную ГФ РФ ФС стоят на страже здоровья людей и являются надёжным гарантом безопасности и эффективности контролируемых по ним лекарственных средств, что в свою очередь предварительно требует проведения основательных исследований химического состава растительного сырья, разработке подходов к стандартизации, методик оценки подлинности и качества как самого сырья, так и получаемых из него субстанций и препаратов.

На примере видов ЛРС, включённых в современную ГФ РФ, прослеживается тенденция к использованию методологического подхода, заключающегося в оценке качества ЛРС и лекарственных растительных препаратов (ЛРП), не по одной, как правило ведущей, а по нескольким группам БАС, которые вносят вклад в фармакологическую активность.

Таким образом, актуальным является разработка обоснованного методологического подхода к исследованию и разработке стандартизации ЛРС, содержащего в качестве ведущей или второй группы БАС фенольные соединения с использованием современных инструментальных методов анализа.

В рецензируемой диссертационной работе Шаилова А.А. рассматривается актуальная проблема, связанная с разработкой методологического подхода к исследованию и стандартизации фармакопейных и перспективных нефармакопейных видов растительного сырья на примере видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., содержащего преимущественно фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды и простые фенолы), с последовательным применением современных инструментальных методов, а также с обоснованием объективных показателей качества лекарственного сырья, содержащего данный класс БАС.

Целью диссертационного исследования Шаилова А.А. является экспериментально-теоретическое обоснование методологических подходов к стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения, на примере некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. и выявление перспектив использования их в отечественной фармации для решения задач по импортозамещению качественными, безопасными и эффективными лекарственными средствами.

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

Данная работа открывает новый взгляд на виды растений родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., вошедших в диссертационное исследование как на источник БАС, содержащих в качестве ведущей группы – фенольные соединения.

Автором разработана оригинальная методология подхода к современной стандартизации видов сырья растений данных родов, содержащих фенольные соединения

С использованием разных видов микроскопического анализа определён полный комплекс диагностических признаков для подтверждения подлинности растительного сырья исследованных видов.

В отечественной фармации впервые для исследуемых видов разработаны методики ТСХ для включения в подраздел «Определение основных групп биологически активных веществ» раздела «Подлинность» соответствующих ФС ГФ РФ на ЛРС, предусматривающих использование в качестве СО доминирующее диагностическое фенольное соединение.

Впервые в отечественной фармации для исследуемых видов предложен метод секвенирования генома как альтернативный и объективный метод, с помощью которого были выявлены внутривидовые участки ДНК.

Для исследуемых видов предложена схема выделения фенольных соединений и полисахаридного комплекса (водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ) с установлением их компонентного состава. Впервые для данного полисахаридного комплекса определены физико-химические показатели (средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность, сорбционная способность). Белковый, аминокислотный и элементный состав исследуемых видов также определён впервые.

Автором впервые проведён фитохимический анализ для образцов, заготовленных на территории Северного Кавказа. В результате данных исследований из листьев брусники обыкновенной выделены 27 соединений, 3 из которых являются новыми. Из побегов данного вида выделено 17 соединений, 3 из которых являются новыми. Впервые из травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной, заготовленных во флоре Северного Кавказа, было выделено 18 соединений, 1 из которых является новым природным соединением – триозидом кверцетина (кверцетин-3-*O*-(4''-*O*- $\beta$ -*D*-ксилопиранозил-6''-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил)- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид).

На примере исследуемых образцов сырья впервые научно обоснована возможность использования в отечественной фармации метода капиллярного электрофореза (КЭ) для анализа сырья, содержащего хлорогеновую и розмариновую кислоты, а также флавоноида гиперозида. Впервые для всех

исследуемых видов ЛРС были разработаны, валидированы и предложены методики количественного определения суммы фенологликозидов, фенолокислот и флавоноидов методом спектрофотометрии, а кроме того, по содержанию основного компонента для соответствующих видов и родов: арбутина (*Arctostaphylos uvae-ursi folia*), хлорогеновой (виды рода *Vaccinium* L.) и розмариновой (виды рода *Prunella* L.) кислот методом капиллярного электрофореза (КЭ) и методом ВЭЖХ.

Для исследуемых нефармакопейных видов растений впервые определены режимы сушки, показатели качества и сроки годности растительного сырья.

Впервые разработана методика количественного определения арбутина методом хроматоспектрофотометрии (взамен титриметрического метода) в ЛРС «Толокнянки обыкновенной листья» и «Брусники обыкновенной листья» для включения в соответствующие ФС ГФ РФ. Впервые разработаны проекты ФС на сырье «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки трава».

Впервые проведён первичный фармакологический скрининг извлечений из исследуемых видов ЛРС, полученных с использованием различных экстрагентов. При этом в результате фармакологических исследований был сделан вывод, что извлечения из вышеперечисленных образцов обладают поливалентным профилем активности, зависящим, прежде всего от преобладающих групп веществ, извлекаемых соответствующими экстрагентами.

Научная новизна и практическая значимость подтверждается патентом РФ на изобретение № 2794752 (рег. 24.04.2023) и двумя ФС включёнными в ГФ РФ XIV издания: «Брусники обыкновенной листья» (ФС.2.5.0063.18) и «Толокнянки обыкновенной листья» (ФС.2.5.0099.18).

Достоверность полученных результатов обоснована и подтверждается выбором научных методов исследования в соответствии с поставленной целью и задачами, большим количеством экспериментальных результатов, статистической обработкой полученных данных согласно требованиям

действующей нормативной документации и воспроизводимостью полученных результатов с валидацией разработанных методик. Основные положения диссертационной работы Шамилова А.А. были доложены в 2015-2024 гг. на 12 научных, научно-практических и научно-методических Всероссийских и Международных конференциях.

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

Выводы, представленные в диссертационной работе Шамилова А.А., полностью соответствуют поставленной цели и сформулированным задачам. Обоснованность научных положений, выводов и 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.

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

Результаты настоящего исследования позволяют объективно и обоснованно подходить к исследованию растений и разработке стандартизации видов ЛРС, содержащих в качестве ведущей группы БАС фенольные соединения, а также к вопросам стандартизации их сырья на этапе разработки ФС. Предложенный автором методологический подход, включает в себя ряд методов и методик, позволяющих избежать ошибки при заготовке и установлении подлинности производящего растения и его сырья, а также рационально и обосновано подходить к выбору критериев методов качественного и количественного анализа при разработке стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения. Методология, представленная в виде алгоритма, позволяет определять подлинность как близкородственных, так и гибридных форм растений с возможностью привлечения в качестве дополнительного метода ДНК-штрихкодирование. Результаты

фитохимического исследования, определения компонентного состава и установления доминирующего компонента в смеси фенольных соединений позволяют совершенствовать существующие фармакопейные методики, а также разрабатывать новые методики для проектов ФС на новые виды сырья. При этом в одной пробе подтверждать и соответствие ЛРС требованиям раздела «Подлинность» подраздела «Определение основных групп биологически активных веществ» методом ТСХ, и подраздела «Количественное определение» раздела ФС «Испытания» - по сумме веществ методом спектрофотометрии, и по доминирующему компоненту с привлечением сепарационного метода анализа (ВЭЖХ или КЭ). Результаты научных исследований, направленных на изучение и определение химической структуры отдельных веществ, являются ключевыми основами для формирования методологии их выделения из сырья. Это, в свою очередь, открывает перспективы для эффективных фармакологических исследований и расширения ассортимента отечественных стандартных образцов (СО).

Полученные автором результаты расширяют перспективы использования ЛРС, содержащего фенольные соединения в качестве эффективных средств растительного происхождения при различных патологических процессах. Разработанная методология исследования даёт возможность её применения на большом количестве как фармакопейных, так и не фармакопейных растений объективно определять показатели подлинности и устанавливать нормы качества ЛРС, содержащего преимущественно фенольные соединения.

Один из перспективных аспектов представленного методологического подхода, описанного в данном диссертационном исследовании, заключается в установлении критериев и разработке алгоритмов выбора методов для определения подлинности, установления химического состава и оценки качества ЛРС, а также для прогнозирования фармакологической активности полученных извлечений на основе расшифрованного химического профиля, используя модель, описанную в аналитических алгоритмах.

Значимость для науки и практики подтверждается включением двух разработанных автором ФС в ГФ РФ XIV издания: «Брусники обыкновенной листья» (ФС.2.5.0063.18. «*Vaccinii vitis-idaeae folia*») и «Толокнянки обыкновенной листья» (ФС.2.5.0099.18. «*Arctostaphylos uvae-ursi folia*»), а также патентом РФ на изобретение № 2794752 (рег. 24.04.2023) и разработанными 4 проектами ФС на новые виды растительного сырья, 6 инструкциями по сбору и сушке исследуемых видов и внедрением разработок в производство, подтверждённых актами внедрения.

### 5. Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Шамилова А.А. изложена на 592 страницах машинописного текста (384 стр. составляет собственно диссертация и 208 стр. - приложение), состоит из введения, списка сокращений, 9 глав (обзор литературы; объекты и методы исследования; 7 глав, содержащих результаты собственных экспериментальных исследований; разработанный методологический подход в виде алгоритма с описанием его принципов), заключения, общих выводов, списка литературы и 8 приложений (на 208 страницах). Работа проиллюстрирована 293 рисунками (109 рисунками - в основной части и 184 рис. вынесены в приложение), включает 201 таблицу, из которых 37 табл. вынесены в приложения. Список литературы включает 458 источников, из них 159 на русском языке и 299 – на иностранных языках.

В главе 1 приведен обзор литературных источников по современному состоянию изученности представителей родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L.

Вторая глава описывает объекты, материалы и методы, используемые при проведении научного исследования.

В третьей главе приведены методы определения подлинности (наряду с классическими методами, приведён метод ДНК-штрихкодирования, люминесцентной микроскопии, а также ТСХ-анализ по наличию и характеру основного компонента и сопутствующих соединений).

В четвертой главе приведены схемы выделения, идентификации, установления структуры соединений фенольной природы. Представлены результаты, полученные на этапе детального фитохимического исследования с использованием сепарационных методов анализа (ВЭЖХ, КЭ) в сочетании с современными методами, которые позволили автору выделять природные доминирующие или диагностически значимые вещества (хроматография), идентифицировать уже известные БАС и устанавливать структуру новых соединений (методами масс-спектрометрии, ЯМР-, УФ-, ИК-спектроскопии).

В пятой главе представлены исследования биополимеров и минеральных веществ исследуемых объектов. Для фракций полисахаридов видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., и *Prunella* L., приведены физико-химические показатели, такие как средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность и сорбционная способность. Автором в этой главе представлены данные о количественном содержании фракций полисахаридов (ВРПС и ПВ) и их мономерном составе. Отражено содержание протеина и его аминокислотного состава, а также сведения о минеральном составе.

В шестой главе представлены методики количественного содержания суммы фенологликозидов, флавоноидов и фенолокислот с использованием спектрофотометрической методики, а также данные о содержании арбутина, хлорогеновой и розмариновой кислот как доминирующих соединений в смеси фенольных соединений с использованием метода КЭ с подтверждением полученных результатов методом ВЭЖХ. В главе также представлена валидация для всех разработанных и предложенных методик.

В седьмой главе представлены числовые данные характеризующие качество ЛРС для внесения в проекты ФС (влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, экстрактивные вещества, примеси, измельченность, сроки годности). В этой главе представлены данные полученные при различных режимах сушки исследуемых объектов, из которых выбраны оптимальные и экспериментально обоснованы автором.

В восьмой главе представлены фармакологические исследования, проведённые в системе *in vitro* и *in vivo*. В главе приведены числовые и графические данные, подтверждающие, что все исследуемые экстракты относятся к V классу токсичности, а также в разной степени обладают диуретическим, антиоксидантным, нейропротекторным, антитиразиновым и актопротекторным действием.

В девятой главе на основании комплексных исследований автор приводит схему и подробное описание этапов методологического подхода к стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения на примере видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L.

Диссертационная работа завершается выводами, заключением, описанием перспектив дальнейших исследований и списком литературы, а также приложением, в котором представлены фотографии гербарных и сырьевых образцов, микрофотографии микроскопии, графики, таблицы с числовыми данными, электрофореграммы, хроматограммы ВЭЖХ, фотографии хроматограмм ТСХ и акты внедрения.

По теме диссертации опубликована 21 статья в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в том числе 8 статей в базе данных *Scopus* и 12 статей в журналах, которые включены в международные базы данных. Получен 1 патент РФ на изобретение (№ 2794752).

Разработанные автором методики определения БАС были валидированы. Они включены в две ФС ГФ РФ XIV издания (ФС.2.5.0063.18; ФС.2.5.0099.18), а также впервые были разработаны, валидированы и включены в проекты ФС впервые методики количественного определения БАС для 4 нефармакопейных видов сырья (*Vaccinii folia*, *Vaccinii uliginosi folia*, *Vaccinii oxycocci cormus* и *Prunellae herba*).

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 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».

Диссертационная работа оформлена в соответствии с современными требованиями Национального стандарта Российской Федерации «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления» (ГОСТ Р 7.0.11-2011), материал хорошо и последовательно изложен.

Вместе с тем, несмотря на общую положительную оценку, по диссертации Шаилова Арнольда Алексеевича имеется ряд замечаний и вопросов:

1. Каковы параметры разработанной методики ВЭЖХ? Какими способами Вы подтверждали идентичность основных пиков розмариновой, хлорогеновой кислот и других фенольных соединений на ВЭЖХ извлечений из сырья, и каким образом рассчитывали количественное содержание отдельных соединений в образцах сырья?
2. При использовании люминесцентной микроскопии какова длина волны, и была ли использована УФ-область облучения микропрепаратов?
3. Каково происхождение СО, использованных в исследовании? Каков критерий, алгоритм выбора СО для анализа ЛРС из ведущей группы БАС? Какова, на Ваш взгляд, роль ФСО для исследованных видов? Почему в разработанной Вами ФС в предлагаемой методике ТСХ (раздел «Подлинность») не включены значения  $R_{st}$ ?
4. Какие выявлены диагностические морфолого-анатомические признаки для клюквы болотной (Выводы к главе 3, С.149)?
5. Результаты по содержанию БАС в воздушно-сухом сырье, полученном способом воздушно-теневого и искусственной до 40 °С

(конвективной и ИК) сушки сопоставимы. Какой способ сушки Вы рекомендуете в итоге и почему? Каким методом определяли влажность анализируемых видов ЛРС?

6. Каким способом определяли количественное содержание веществ, представленных в Табл. 4.2 (С. 155) – Табл. 4.12 (С. 173)?

7. С помощью каких методов была установлена и доказана химическая структура новых соединений? Почему Вы не предлагаете тривиальное название новому природному соединению, например, «прунелозид»?

8. С чем Вы связываете наибольшее повышение работоспособности животных при использовании водных извлечений по сравнению со спиртовыми? Какова корреляция между содержанием БАС и фармакологической активностью препаратов изучаемых видов? Как Вы связываете профиль фармакологической активности с определённой группой БАС?

9. Что Вы можете сказать о ресурсах исследуемых видов? Какие природоохранные ресурсосберегающие меры предусмотрены Вами при составлении инструкций по сбору и сушке сырья от изученных видов растений?

10. Какова целесообразность использования капиллярного электрофореза для количественного определения арбутина в ЛРС толокнянки и других видов? В чём преимущества и недостатки КЭ перед ВЭЖХ в данном определении?

11. В чём кратко заключается суть алгоритма исследования сырья, содержащего преимущественно фенольные соединения? В чём кратко - суть алгоритма разработки методик количественного определения БАС в ЛРС?

В диссертационной работе и автореферате имеются отдельные опечатки и стилистические неточности.

Перечисленные вопросы и замечания носят уточняющий характер, замечания не принципиальны и в целом не снижают ценности данной работы.

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

Последовательность изложения, содержание материала и выводов в диссертации и автореферате совпадают. Научные положения диссертационной работы соответствует шифру специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты, полученные в ходе выполнения экспериментальной работы, соответствуют области специальности, пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

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

Таким образом, диссертационная работа Шамилова Арнольда Алексеевича 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 учёной степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной проблемы современной фармацевтической химии и фармакогнозии связанной с разработкой современного подхода к стандартизации растительного сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L., как потенциальных источников ведущей группы биологически активных веществ фенольной природы, а также с перспективами расширения на их основе арсенала безопасных, качественных, эффективных отечественных, импортозамещающих лекарственных средств.

