

ОТЗЫВ официального оппонента

профессора кафедры фармации и клинической фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, доцента **Моисеева Дмитрия Владимировича** 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 ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность выполненного исследования

В настоящее время ассортимент лекарственных препаратов растительного происхождения постоянно расширяется, поэтому ведутся масштабные научные исследования, в том числе и затрагивающие различные аспекты стандартизации новых видов лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе. Эффективная реализация подобного подхода может быть достигнута путем комплексного подхода к исследованию перспективных растительных объектов с целью последующего внедрения их в медицинскую практику. Известно, что классификация лекарственного растительного сырья (ЛРС) по химическому составу имеет первостепенное значение для фармакогнозии. Химическая природа биологически активных соединений должна рассматриваться как методологическая основа в плане разработки новых подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на их основе.

В монографиях в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания большая часть растительных объектов стандартизируется по содержанию фенольных соединений, среди которых доминирует растительное сырье, содержащее флавоноиды.

Таким образом, актуальным является разработка методологического подхода к стандартизации растительного сырья, содержащего фенольные соединения, с использованием современных инструментальных методов анализа вкупе с существующими методиками.

В диссертационной работе Шамилова А.А. приведены новые подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего

фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы), на примере некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., а также выявлены перспективы дальнейшего использования их в практическом здравоохранении. Одной из перспективных концепций методологического подхода, описанного в данном диссертационном исследовании, является установление критериев и разработка алгоритма выбора методов для определения подлинности, установления химического профиля и оценки качества ЛРС, а также прогнозирование фармакологической активности полученных извлечений.

Целью диссертационного исследования Шамилова 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 фармации. Большая часть изучаемых объектов является представителями флоры Северного Кавказа.

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Научная новизна диссертационной работы Шамилова А.А. заключается в следующем:

1. Впервые с использованием разных видов микроскопического анализа (стерео-, люминесцентная микроскопия, микроскопия в проходящем свете) определены показатели подлинности ЛРС, заключающиеся в комплексе диагностических признаков: для родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. *Prunella* L. по наличию и характеру люминисценции на листовой пластинке трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомо-диагностических признаков дополнительно черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян.

2. Впервые для исследуемых видов предложен метод ТСХ для внесения в монографии на ЛРС «Определение основных групп биологически активных веществ», предусматривающий в качестве СО диагностическое, доминирующее соединение. Впервые для исследуемых видов предложен метод секвенирования генома как альтернативный и объективный метод, с помощью которого были выявлены внутривидовые участки ДНК.

3. Впервые для исследуемых видов предложена схема выделения фенольных соединений и полисахаридного комплекса (водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ) с установлением их компонентного состава. Впервые изучен их аминокислотный и элементный состав. Для образцов флоры Северного Кавказа фитохимический анализ проведен впервые.

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

5. Впервые для полисахаридного комплекса (ВРПС и ПВ), выделенного из исследуемых объектов, определены физико-химические константы (средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность, сорбционная способность).

6. Впервые для всех исследуемых видов ЛРС были разработаны, валидированы и предложены методики количественного определения суммы фенологликозидов, фенолокислот и флавоноидов (УФ- спектроскопия) и основного по содержанию компонента в сумме (метод КЭ).

7. Впервые определены для исследуемых видов ЛРС (за исключением толокнянки обыкновенной листьев, брусники обыкновенной листьев) режимы сушки, показатели качества сырья и сроки годности.

8. Впервые для внесения в ФС ГФ РФ XIV издания на толокнянки обыкновенной листья и брусники обыкновенной листья предложена спектрофотометрическая методика (взамен титриметрического метода) определения арбутина. Впервые разработаны проекты ФС на сырье «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки трава».

9. Впервые проведен первичный скрининг извлечений полученных из исследуемых видов ЛРС с использованием различных экстрагентов, таких как вода очищенная, спирт этиловый 40%, спирт этиловый 70% и спирт этиловый 96%. Впервые в результате фармакологических исследований был сделан вывод, что извлечения из вышеперечисленных образцов обладают поливалентным профилем активности, зависящим, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

Научная новизна диссертационной работы Шамилова А.А. подтверждена патентом РФ на изобретение № 2794752 (от 24.04.2023) «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Достоверность полученных результатов подтверждается, сформулированными автором выводами и практическими рекомендациями, которые базируются на достаточном объеме выполненных исследований, реализованных на сертифицированном и поверенном оборудовании. Достоверность результатов подтверждена соответствующими графиками, таблицами и рисунками. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны, согласно требованиям действующей нормативной документации. Проанализирован значительный объем литературных источников как отечественных. Основные положения работы были доложены на конференциях различного уровня.

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

Обоснованность основных научных положений, выводов и практических рекомендаций, представленных в диссертационной работе Шамилова А.А., подтверждается достаточным объемом и квалификационным уровнем выполненного эксперимента. Научные положения и выводы сформулированные в диссертации, являются обоснованными, достоверными и полностью соответствуют поставленным задачам.

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

В результате выполнения диссертационного исследования Шамиловым А.А. разработан методологический подход, принципы которого были представлены в виде алгоритма. Важно отметить, что предложенный методологический подход, включает в себя ряд методов и методик, позволяющий 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 работе Шамилова А.А., позволяет определять подлинность как близкородственных, так и гибридных форм растений с возможностью привлечения в качестве дополнительного метода ДНК-штрихкодирование. Результаты фитохимического исследования, определения основного состава и установления доминирующего компонента в смеси фенольных соединений позволяют совершенствовать существующие

фармакопейные методики, а также разрабатывать новые методики для впервые введенных проектов ФС на новый вид сырья. Автором предложена методика, в которой в одной пробоподготовке можно определять методом ТСХ фармакопейный показатель «Определение основных групп биологически активных веществ», «Количественное определение» по сумме веществ (УФ спектроскопия) и доминирующему компоненту с привлечением сепарационного метода анализа. Результаты научных исследований, направленных на изучение и определение химической структуры отдельных веществ, являются ключевыми основами для формирования методологии их получения. Это, в свою очередь, открывает эффективные перспективы для фармакологических исследований и расширения ассортимента отечественных стандартных образцов. Продемонстрирован поливалентный профиль активности ЛРС, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ. Учтено наличие в суммарном извлечении содержание биополимеров и макро- и микроэлементов, что позволяет не только прогнозировать фармакологические виды активности, но и впоследствии рационально подходить к разработке лекарственной формы.

Стоит отметить, что перспективным аспектом представленного методологического подхода, описанного в данной диссертации, заключается в установлении критериев и разработке алгоритмов выбора методов для определения подлинности, установления химического профиля и оценки качества ЛРС, а также для прогнозирования фармакологической активности полученных извлечений на основе расшифрованного химического профиля, используя модель, описанную в аналитических алгоритмах.

В ходе исследования автором были разработаны методики, включенные в монографии «Толокнянки обыкновенной листья» и «Брусники обыкновенной листья» ГФ РФ XIV издания. Установлены нормы показателей качества, которые вошли в проекты нормативных документов по качеству на «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы» (компании «Марьин Луг» ИП Повышева). На все исследованные виды ЛРС разработаны инструкции по сбору и сушки, утвержденные в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН).

Полученные автором результаты можно использовать в учебно-методическом процессе при преподавании на кафедрах фармацевтического профиля, а также на фармацевтических предприятиях по производству ЛРС.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа соискателя написана в традиционной форме и изложена на 592 страницах машинописного текста, представлена 293 рисунками и 204 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части из 5 глав, заключения, общих выводов, Приложения, списка сокращений и списка литературы, включающего 458 источников (159 на русском языке и 299 – на иностранных).

В главе 1 «Обзор литературы» приведены ботанико-таксономические, химические и биологические сведения представителей родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L., а также методы анализа и стандартизация их сырьевых источников.

Во второй главе приведены сведения об объектах исследования, местах заготовок их сырьевых источников, а также подробно описаны материалы и методы, используемые при проведении научного исследования (генетические, химические, биологические и др.).

В третьей главе описаны классические и современные методы определения подлинности. Подробно описано макро и микроскопические признаки, а также признаки, выявленные с помощью стерео и люминесцентной микроскопии. Приведены данные, полученные с помощью ДНК-штрихкодирования.

В четвертой главе приведены данные о компонентном составе фенольных соединений, полученные при помощи метода ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием. Детально описаны этапы и приведены схемы выделения фенольной природы. Представлены результаты, полученные на этапе детального фитохимического исследования с использованием сепарационных методов анализа в сочетании с методами, которые позволяют объективно установить структуру новых соединений (методом масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии). Приведены сведения о доминирующих соединениях, которые могут использоваться в качестве аналитических маркеров.

В пятой главе представлены сведения о полисахаридах и их мономерах, аминокислотах, а также о минеральных веществах исследуемых объектов. Для фракций полисахаридов определены физико-химические показатели, такие как средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность и сорбционная способность.

В шестой главе автором разработаны методики количественного определения суммы фенологликозидов, флавоноидов и фенолокислот методом спектрометрии, а также приведены данные о содержании компонентов: арбутина, хлорогеновой и розмариновой кислот как маркерных соединений в смеси фенольных соединений с использованием метода

капиллярного электрофореза как альтернативного методу ВЭЖХ. Полученные данные методом капиллярного электрофореза были подтверждены методом ВЭЖХ. Все разработанные и предложенные методики были валидированы по основным показателям, рекомендуемым актуальными изданиями ГФ РФ.

В седьмой главе приведены данные по стандартизации изучаемого растительного сырья. Для внесения в проекты монографий были установлены и представлены следующие обязательные показатели качества: влажность (потеря в массе при высушивании), измельченность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной (хлороводородной) кислоте, примеси, экстрактивные вещества, обоснованы сроки годности. В главе представлены результаты, полученные экспериментальным путем по установлению режимов сушки исследуемых объектов.

В восьмой главе представлены фармакологические исследования. Автором проведены доклинические исследования. В главе приведены данные, подтверждающие, что все исследуемые экстракты из растительного сырья относятся к V классу токсичности, а также обладают диуретическим, антиоксидантным, нейропротекторным, антитиразиновым и актопротекторным действием.

В девятой главе автором обобщены полученные результаты и были сведены в единую и последовательную методологическую схему с подробным описанием ее этапов. В главе предложен методологический подход к стандартизации лекарственного растительного сырья, 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. В приложении представлены фотографии гербарных и сырьевых образцов, микрофотографии микроскопии, графики, таблицы с числовыми данными, электрофореграммы, ВЭЖХ хроматограммы, фотографии ТСХ хроматограмм и акты, подтверждающие практическую значимость результатов.

По теме диссертации автором опубликована 21 печатная работа, из них 21 статья в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в том числе 8 статей в базе данных Scopus; в том числе 12 статей в журналах, которые включены в международные базы данных. В результате фармакологических и фармакогностических исследований получен 1 патент на изобретение: «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Полученные автором результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный

университет», а также для входного контроля качества ЛРС на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

Диссертационная работа оформлена с учетом современных требований, материал изложен грамотно и логически последовательно. Однако, несмотря на общую положительную оценку, по диссертационной работе Шамилова Арнольда Алексеевича возникли вопросы и замечаний:

1. В литературном обзоре на стр. 39 сравнивается гипогликемическая активность спиртового экстракта из плодов [213] и водного экстракта из листьев черники кавказской [176]. Как объяснить сходный фармакологический эффект для данных экстрактов?

2. В каком количестве повторностей проводили количественное определение БАВ в растительном сырье методом ВЭЖХ?

3. Для чего стандартный образец рутина перед проведением анализа высушивается в течение двух часов при температуре 132-135 °С (стр. 251)? И как тогда учитывается влага в стандартном образце?

4. Как можно объяснить разницу в два и более раза в количественном содержании суммы БАВ или индивидуальных соединений в исследуемых объектах, заготовленных в одинаковые периоды вегетации? Например, табл. 6.32 (стр. 245), табл. 6.35 (стр. 249), табл. 6.41 (стр. 256) и др.

5. Почему при записи спектров водно-спиртовых извлечений появляются отрицательные значения оптической плотности относительно раствора сравнения (Рис. 6.2, 6.8, 6.9, 6.11, 6.16, 6.20, 6.25, 6.26, 6.27, 6.38, 6.39 в главе 6)?

6. Чем была обусловлена необходимость использования в доклинических исследованиях линейных животных?

7. Каким образом проводилась стандартизация сухих экстрактов для доклинических исследований?

8. Согласно ГФ РФ XIII издания и в последующих изданиях используются сита с размером отверстий 710, 1000, 1400, 2000, 2800, 4000 мкм. Какие сита использовал соискатель при фракционировании сырья с размером частиц 1, 2 и 3 мм и как проводилось разделение на фракции?

9. Как изменялись показатели «Допустимые примеси» (почерневшие и побуревшие листья/побеги) и «Потеря в массе при высушивании» в процессе хранения?

10. По тексту диссертации используются неудачные выражения: «микробиологический контроль» для линейных животных (стр.84), «сепарационные методы» (рис.6.1), «время миграции» или «характер пика» (стр.208), «делим на порции» (стр.278), «консервация основных групп БАВ» (стр.278) и другие.

11. При использовании метода ВЭЖХ не указаны такие параметры, как разрешение пиков и селективность разделения, не приведены параметры оценки пригодности хроматографической системы.

12. Все методики следует излагать с учетом точности измерительного оборудования. Например, «точная навеска 50,0 мг» (п. 1.2. стр.22 т.1. ч.1 ФЕАЭС), а не «около 0,05 г (точная навеска)» стр.260 диссертации. А полученные результаты округлять и представлять с учетом значащих цифр.

13. Нумерация таблиц в экспериментальных главах и Приложении совпадает. Например, таблица 7.3 (стр.282) и таблица 7.3 (стр. 558).

14. В работе и автореферате имеются опечатки, стилистические неточности и неудачные выражения.

Перечисленные замечания носят уточняющий характер и не снижают общего положительного впечатления от диссертационной работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата Шаилова Арнольда Алексеевича полностью соответствует основным положениям и выводам диссертации. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам: 2 - Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.; 3 - Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления; 6 - Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

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

Таким образом, диссертационная работа Шаилова 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 ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершённой научной

квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной проблемы современной фармацевтической химии и фармакогнозии, затрагивающая различные аспекты совершенствования контроля качества лекарственных средств, в частности, методологического подхода к стандартизации растительного сырья, содержащего фенольные соединения.

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

Профессор кафедры фармации и клинической фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент

Моисеев Дмитрий Владимирович

170100, Российская Федерация, Тверская область, г. Тверь, улица Советская, дом 4, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Телефон: +7-911-393-1194; e-mail: ussr80@yandex.ru

25 сентября 2024 г.



С отзывом ознакомлен 05.10.2024 Шамилов