

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента заведующего кафедрой фармакогнозии и ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора Бубенчиковой Валентины Николаевны по диссертации Хасановой Светланы Рашитовны на тему: «Экспериментально-теоретическое обоснование создания и стандартизации лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

### **Актуальность выполненного исследования**

Большое внимание в последнее время уделяется исследованию антиоксидантных свойств растительных средств. Это обусловлено тем, что многие процессы, протекающие в организме, тесно связаны со свободно-радикальным окислением. Снижение естественной антиоксидантной активности вызывает в организме увеличение концентрации активных форм кислорода, являющихся причиной различных заболеваний. Одной из изученных групп растительных антиоксидантов являются полифенольные соединения. Наиболее исследованы антиоксидантные свойства флавоноидов, которыми и объясняется широкий спектр их биологического действия. В связи с перспективами использования данного класса соединений, наблюдается значительный интерес к исследованию их биологических свойств. Доказано, что флавоноиды являются «ловушками» свободных радикалов и предотвращают перекисное окисление липидов. Также флавоноиды способны активировать природные механизмы клеточной защиты от окислительного стресса через экспрессию внутриклеточных ферментов. Исследованы взаимосвязи антиоксидантных свойств и строение флавоноидных структур. Экспериментальные данные свидетельствуют о корреляции между антиоксидантным действием и количеством фенольных гидроксильных групп в их молекулах. На основании многочисленных экспериментальных исследований установлено антиоксидантное действие более 50 выделенных флавоноидов.

Среди наиболее изученных на сегодняшний день свободнорадикальных патологий являются заболевания сердечно-сосудистой системы, которые по

данным Всемирной организации здравоохранения занимают одно из ведущих мест по распространенности и первое место по числу смертности среди населения. Имеющийся клинический опыт и результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о важной роли оксидантного стресса в формировании и прогрессировании сердечно-сосудистой патологии, необходимости ранней, планомерной и комплексной антиоксидантной коррекции.

Расширение ассортимента антиоксидантных лекарственных средств на основе отечественной растительной сырьевой базы является одной из актуальных задач современной фармации. Возможным решением данной задачи является внедрение в практику новых сборов и новых видов лекарственного растительного сырья уже изученных растений. Одним из таких видов являются листья боярышника кроваво-красного. Лекарственные препараты из листьев боярышника существуют на отечественном фармацевтическом рынке, однако нормативной документации на этот вид сырья отсутствует. В связи с этим диссертационная работа Хасановой Светланы Рашитовны является актуальной и посвящена созданию методологических подходов по разработке лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний является актуальным.

Диссертационная работа Хасановой С.Р. посвящена теоретическому и экспериментальному обоснованию создания и стандартизации лекарственных растительных средств с антиоксидантной активностью для профилактики и комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Для реализации поставленной цели были решены следующие задачи: обобщены современные данные по исследованию и использованию антиоксидантов, распространенности заболеваний сердечно-сосудистой системы, применения лекарственных растений для их профилактики, лечения и расширения возможности использования сырья боярышника; разработке методологических подходов к созданию растительных препаратов с антиоксидантной активностью на основе лекарственного растительного сырья для профилактики и комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний; проведению скрининга по выявлению антиоксидантных свойств лекарственного растительного сырья для разработки сборов для профилактики и комплексного лечения сердечно-сосудистых заболеваний; проведению комплексного фармакогностического исследования сборов «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-НМК»; морфолого-анатомического и фитохимического изучения

нового вида лекарственного растительного сырья - листьев боярышника кроваво-красного из флоры Республики Башкортостан; разработке методик качественного и количественного анализа сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного; определению критериев подлинности и доброкачественности, необходимых для стандартизации; проведению технологических исследований по разработке лекарственных форм на основе сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного; изучению токсико-фармакологических свойств сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного; разработке проектов нормативной документации на сборы, листья боярышника кроваво-красного и лекарственные формы на их основе.

**Новизна исследования и полученных результатов, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Для достижения поставленной цели Хасановой С.Р. разработаны методологические подходы к созданию новых растительных средств на основе природных антиоксидантов для профилактики и комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Автором проведен фармакологический скрининг антиоксидантной активности 25 видов лекарственного растительного сырья и 145 различных сочетаний на их основе. Теоретически и экспериментально обоснованы составы двух новых сборов «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-НМК». Проведено комплексное фармакогностическое изучение сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного.

С использованием современных физико-химических методов анализа (ВЭТСХ, ГХ/МС, ВЭЖХ, ЯМР-, УФ- и ИК-спектроскопия) изучен компонентный состав биологически активных веществ листьев боярышника кроваво-красного и идентифицировано 70 соединений различной природы. С использованием колоночной хроматографии из листьев боярышника кроваво-красного выделено и с применением ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопии установлена структура 17 фенольных веществ. Впервые в листьях боярышника кроваво-красного обнаружены изовитексин, физетин, дигидрокверцетин, нарингин, гесперидин, кофейная и хлорогеновая кислоты. В листьях боярышника кроваво-красного методом ВЭЖХ идентифицированы 5 флавоноидов, из которых впервые байкалеин. Методом ГХ/МС в листьях боярышника кроваво-красного впервые идентифицированы 6 веществ, 4 из них - соединения фенольной природы: кумаран,  $\alpha$ -гидрохинон, пирокатехин и

хинная кислота. Изучен компонентный состав эфирного масла листьев боярышника кроваво-красного и идентифицировано 18 соединений. В липофильной фракции листьев боярышника кроваво-красного идентифицированы 19 веществ. Впервые методами ВЭЖХ и ГЖХ установлен состав полисахаридов листьев боярышника кроваво-красного.

Изучена динамика накопления основных групп БАВ листьев боярышника кроваво-красного в различные фазы вегетации растения и определены сроки их заготовки.

Исследован химический состав сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного с использованием фитохимических, хроматографических, спектроскопических методов анализа. В сборах «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьях боярышника кроваво-красного установлено содержание флавоноидов, органических кислот, кумаринов, суммы дубильных соединений, сапонинов, аскорбиновой кислоты, полисахаридов, каротиноидов, эфирных масел, аминокислот, макро- и микроэлементов.

Изучены морфолого-анатомические признаки сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного и установлены диагностически-значимые признаки, которые предложены в качестве критерия стандартизации. При проведении микроскопического исследования листьев боярышника выявлены новые анатомио-диагностические признаки. Впервые проведено морфолого-анатомическое исследование черешка и прилистников боярышника кроваво-красного.

Разработаны критерии подлинности и показатели качества сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного и проведена их стандартизация.

Изучена острая токсичность разработанных сборов и листьев боярышника кроваво-красного и установлено, что они относятся к 4 классу «Вещества малотоксичные». В ходе фармакологических исследований впервые установлены антиоксидантные, кардиотропные, антикоагулянтные, антиагрегантные, антигипоксические свойства сбора «Кардиофит-ИБС»; антиоксидантные, антикоагулянтные, антиагрегантные, антигипоксические свойства сбора «Ангиофит-НМК»; антиоксидантные, кардиотропные, антиаритмические свойства листьев боярышника кроваво-красного.

Исследованы оптимальные условия получения водных извлечений из сборов «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-НМК». Изучены оптимальные условия и разработана технология получения жидких экстрактов из сборов «Кардиофит-

ИБС», «Ангиофит-НМК» и густого экстракта из листьев боярышника кроваво-красного.

Приоритет и новизна исследований подтверждена тремя патентами: «Сбор лекарственных растений для профилактики и лечения нарушений мозгового кровообращения», «Сбор лекарственных растений для профилактики и лечения ишемической болезни сердца», «Способ местного лечения и профилактики основных стоматологических заболеваний у лиц пожилого и старческого возраста с применением жевательного субстрата».

Диссертационная работа выполнена с использованием фармакогностических, химических, технологических, хроматографических методов (колоночная, тонкослойная, газожидкостная и высокоэффективная жидкостная хроматография), спектральных методов (ЯМР-, УФ-, ИК-спектроскопия и масс-спектрометрия), а также методов исследований специфической фармакологической активности. Установление строения выделенных веществ осуществлено с помощью ЯМР-, масс-, УФ- и ИК-спектроскопии.

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных. Статистическая обработка экспериментальных данных исследований ( $P=95\%$ ) проведена с помощью программ Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения в соответствии с требованиями ГФ-ХІ издания.

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

Результаты проведенных Хасановой С.Р. исследований имеют несомненное научно-практическое значение, которые в дальнейшем могут быть использованы в научном, учебном процессе, а также на предприятиях реального сектора экономики.

Автором разработаны критерии подлинности и показатели качества сборов и листьев боярышника кроваво-красного, необходимые для их стандартизации.

Разработаны методики анализа: методика качественного анализа методом ТСХ, методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в листьях боярышника кроваво-красного, сборах «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-НМК»; методика качества сборов «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-

НМК» по количественной оценке проявляемости анатомических диагностически-значимых признаков.

Проведенные исследования позволили обосновать возможность расширения отечественной номенклатуры официального сырья - листьев боярышника кроваво-красного и сборов «Кардиофит-ИБС» и «Ангиофит-НМК». Результаты фармакологических испытаний подтвердили целесообразность разработанных методологических подходов к созданию новых растительных лекарственных средств для профилактики и комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

На основании проведенных исследований разработаны проект фармакопейной статьи «Боярышника кроваво-красного листа» (проходит экспертизу в ФГУ «НЦЭСМП» Минздрава России с целью включения в Государственную Фармакопею XIII издания), проекты фармакопейной статьи предприятия «Сбор «Кардиофит-ИБС», «Сбор «Ангиофит-НМК», «Жидкий экстракт из сбора «Кардиофит-ИБС», «Жидкий экстракт из сбора «Ангиофит-НМК», «Густой экстракт боярышника кроваво-красного листьев», инструкция по сбору и сушке листьев боярышника кроваво-красного.

Результаты исследований включены в монографии С.Р. Хасановой, Н.В. Кудашкиной [и др.] «Фитотерапия артериальной гипертензии» (2009), С.Р. Хасановой, Н.В. Кудашкиной [и др.] «Фитотерапия в гинекологии» (2008), С.Р. Хасановой, Н.В. Кудашкиной [и др.] «Фитотерапия инфекционных заболеваний» (2009), С.Р. Хасановой, Н.В. Кудашкиной [и др.] «Фитотерапия в урологии» (2011).

Результаты диссертации внедрены в работу ГКУЗ Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств Республики Башкортостан, ООО «Травы Башкирии», ООО «Фитоцентр Гордеева», в учебный процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России.

Результаты проведенных исследований позволили создать методологическую базу для создания подходов к разработке новых растительных средств с антиоксидантной активностью, а также расширить возможности целенаправленного поиска новых сырьевых источников получения эффективных отечественных антиоксидантных фитопрепаратов для использования в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

#### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 270 отечественных и 113 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 87 таблицами и 112 рисунками.

Достоверность полученных результатов подтверждается обширным экспериментальным материалом, который приведен в традиционной для экспериментальных работ форме. После введения, которое включает разделы: актуальность, степень разработанности проблемы, цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость, положения, выносимые на защиту и другие, следует обзор литературы (глава 1), в котором обсуждено современное состояние вопроса исследований по использованию антиоксидантов при свободно-радикальных патологиях, применению лекарственного растительного сырья и растительных препаратов при сердечно-сосудистых заболеваниях и степени изученности химического состава и фармакологических свойств листьев различных видов боярышника. Обзор литературы достаточно полно отражает актуальность проблемы и существующие пути ее решения. Большое внимание уделено применению при сердечно-сосудистых заболеваниях антиоксидантов и используемых в настоящее время растительных препаратов. Автор приводит обзор современных исследований химического состава и фармакологических свойств растений рода *Crataegus*.

Из обзора литературы логично следует выбор объектов исследования и задач, которые необходимо решить для разработки растительных препаратов с антиоксидантной активностью на основе лекарственного растительного сырья для профилактики и комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

В главе 2 представлена характеристика объектов и методов исследования; приведены методики химических исследований лекарственного растительного сырья, статистического анализа, технологических и фармакологических исследований. Главы 3-8 экспериментальные, содержащие результаты обширных, разноплановых исследований и их обсуждение.

В главе 3 приведены результаты теоретического и экспериментального обоснования и создания методологических подходов по разработке новых лекарственных растительных препаратов для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

В главе 4 обсуждаются результаты морфолого-анатомического исследования листьев боярышника кроваво-красного, в результате которого

определены основные характерные диагностически значимые признаки, необходимые для определения подлинности сырья; впервые проведено морфологическое и микроскопическое исследование прилистников, черешка листа боярышника кроваво-красного и выявлены новые анатомо-диагностические признаки. Приведены результаты комплексного фармакогностического изучения листьев боярышника кроваво-красного, разработана схема выделения биологически активных веществ, исследован их химический состав с использованием современных физико-химических, хроматографических, спектроскопических методов анализа (ГХ/МС, ВЭЖХ, ЯМР-, масс-, УФ- и ИК-спектроскопия).

В главе 5 обсуждаются результаты морфолого-анатомического исследования сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК», в результате которого определены основные характерные диагностически значимые признаки, необходимые для определения подлинности сборов. Приведены результаты комплексного фармакогностического изучения сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК».

В главе 6 приводятся экспериментальные данные по содержанию биологически активных веществ в «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК», листьев боярышника кроваво-красного. Исследована динамика накопления действующих веществ в листьях боярышника кроваво-красного. Разработаны показатели подлинности и качества сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК», листьев боярышника кроваво-красного и проведена их стандартизация.

В главе 7 приведены результаты технологических исследований по разработке лекарственных форм на основе сборов и листьев боярышника кроваво-красного.

В главе 8 отображены результаты определения токсичности и изучения фармакологической активности сборов «Кардиофит-ИБС», «Ангиофит-НМК» и листьев боярышника кроваво-красного.

По теме диссертации Хасановой С.Р. опубликовано 59 работ, из них 21 статья в журналах, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ. Получены 3 патента на изобретение, изданы 4 монографии, подготовлены инструктивные письма, акты внедрения.

Результаты диссертационных исследований неоднократно обсуждались на конференциях различного уровня.

Результаты исследовательской работы Хасановой С.Р. используются в практической работе ГКУЗ Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств Республики Башкортостан, ООО «Травы



Башкирии», ООО «Фитоцентр Гордеева», а также в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России (акты внедрения приведены в приложении диссертации).

Полученные автором результаты можно использовать для создания и стандартизации новых лекарственных растительных препаратов и для целенаправленного поиска новых сырьевых источников получения эффективных отечественных антиоксидантов.

Оценивая работу, хотелось бы отметить целостность исследований, последовательность и логичность изложения материала. Диссертационная работа оформлена в соответствии с современными требованиями, достаточно хорошо написана и иллюстрирована. Полученные в диссертационной работе результаты достоверны, выводы аргументированы.

В целом положительно оценивая диссертационную работу Хасановой С.Р. имеются некоторые вопросы, замечания и пожелания:

1. В работе большой по объему литературный обзор. Приводится много известной литературы. Раздел 1.4 посвящен растениям рода боярышник, где приводится описание химического состава и фармакологических свойств многих видов, в то время как в дальнейшем автор изучает листья боярышника кроваво-красного. На наш взгляд достаточно было бы в литературном обзоре привести изученность химического состава боярышника кроваво-красного.
2. Во 2 главе автор приводит реакцию с  $\text{FeCl}_3$  для отличия групп флавоноидов. На наш взгляд выбор реакции не совсем удачен, есть более специфические реакции, тем более что в сырье обычно содержатся различные группы флавоноидов, что мы видим и из исследований диссертации и различить их с помощью этой реакции не возможно.
3. В состав сбора включено сырье, содержащее алкалоиды, как предполагается использовать этот сбор в домашних условиях?
4. Автор пишет (страница 201), что разработан проект ФСП, в настоящее время нет ФСП, а есть нормативный документ.
5. При приведении данных количественного определения (страница 204 и др.) значения нужно приводить до одного знака, например  $0,55\% \pm 0,05$ ;  $0,4 \pm 0,03\%$ .

6. На странице 206 в тексте таблицы 5.25 приводятся одни значения  $R_f$  для исследуемых веществ на хроматограмме, а под таблицей при ее обсуждении совсем другие, например зона с  $R_f$  около 0,53 идентифицирована как хлорогеновая кислота, а в таблице этих значений нет и т.д.
7. На наш взгляд не совсем удачно название главы 6 «Разработка методов стандартизации...», а в главе часть приведенного материала соответствует фитохимическому изучению, который было бы лучше представить в главе 5.
8. Не понятно, как определяли аминокислотный состав рентгенофлуоресцентным методом, тем более, что в ссылках, приведенных в тексте диссертации (61, 155) на этот метод, нет определений аминокислотного состава. Автор на странице 217 указывает, что определял 10 незаменимых аминокислот, а каких не указывает (их вообще насколько мне известно 8).
9. Как автор может объяснить такое различие в содержании флавоноидов, определяемое различными методами (страница 220) в исследуемых видах сырья?
10. В работе имеются неудачные выражения, например «бурый» цвет и т.д., опечатки.

Указанные замечания не принципиальны, а вопросы носят только уточняющий характер и не снижают ценности большой и актуальной работы.

### **Соответствие содержания автореферата**

#### **основным положениям и выводам диссертации**

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с современными требованиями и полностью соответствует основным положениям и выводам диссертации.

#### **Заключение о соответствии диссертации требованиям настоящего**

#### **Положения**

Таким образом, диссертационная работа Хасановой Светланы Рашитовны «Экспериментально-теоретическое обоснование создания и стандартизации лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью», представленная на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение крупной проблемы современной фармации по созданию методологических подходов по разработке новых растительных средств и

целенаправленного поиска новых сырьевых источников получения эффективных отечественных антиоксидантных препаратов и по вопросам импортозамещения лекарственных средств.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа «Экспериментально-теоретическое обоснование создания и стандартизации лекарственных растительных препаратов с антиоксидантной активностью» Хасановой Светланы Рашитовны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

### **Официальный оппонент**

Заведующий кафедрой фармакогнозии  
и ботаники государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
профессионального образования «Курский  
государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
305041, г. Курск, ул. К.Маркса, д.3  
тел. 8(4712)58-81-32, e-mail:kurskmed@mail.ru  
доктор фармацевтических наук,  
профессор

Бубенчикова Валентина Николаевна

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г

Подпись профессора В.Н. Бубенчиковой заверяю  
Начальник отдела кадров

Н.Н. Сорокина