

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

главного научного сотрудника отдела химии природных соединений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора РАН Зилфикарова Ифрата Назимовича на диссертационную работу Дьяковой Нины Алексеевны на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование эколого-фармакогностической оценки качества лекарственного растительного сырья (на примере Воронежской области)», представленную в Диссертационный Совет ДСУ 208.002.02 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность избранной темы

Несмотря на большой ассортимент высокоэффективных синтетических лекарственных средств, фитотерапия продолжает занимать важное место в системе лечебно-профилактических мероприятий в медицинской практике. Однако экологический прессинг и антропогенные факторы оказывают существенное влияние на образование и накопление в лекарственных растениях биологически активных веществ, их фармакотерапевтическую эффективность и безопасность. Разработка и производство современных и безопасных лекарственных препаратов природного происхождения требует использования лекарственного растительного сырья (ЛРС), отвечающего современным требованиям качества.

Выполненная диссертация посвящена актуальной фармакогностической проблематике – региональной эколого-гигиенической оценке качества ЛРС. Актуальность исследования в значительной мере обусловлена потенциальным ростом потребности в ЛРС российского происхождения для нужд фармации и медицины в условиях возросшей необходимости импортозамещения. К настоящему времени в России проведены комплексные крупномасштабные исследования по мониторингу качества ЛРС в ряде субъектов, в том числе в рамках многолетних грантовых программ, что подчеркивает их актуальность, однако работы, касающиеся эколого-гигиенической оценки качества ЛРС в регионах Центрального Черноземья, в частности, в Воронежской области, единичны, не систематизированы, носят фрагментарный характер.

Проведенные Н.А. Дьяковой эколого-фармакогностические исследования, посвященные изучению влияния антропогенного загрязнения на состав примесей и накопление биологически активных веществ (БАВ), вопросов рационального использования ресурсов ЛРС на примере десяти модельных видов, в силу предлагаемого комплексного подхода, имеют важное научное и практическое значение не только для Центрально-Черноземного района, но и для России в целом.

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

Научные положения диссертационной работы Нины Алексеевны Дьяковой базируются на результатах экспериментов с использованием современного аналитического оборудования и математических методов обработки данных.

Научные выводы и рекомендации основаны на достаточном объёме экспериментального материала, логически вытекают из результатов исследования и непротиворечивы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Автором диссертации в обзоре литературы на основе изучения большого объема данных (483 источников) критически проанализированы научные данные о растительных объектах исследования, проблеме загрязнения верхних слоев почв и ЛРС наиболее опасными экотоксикантами - тяжелыми металлами и мышьяком, пестицидами, радионуклидами природными и техногенными, загрязнении ЛРС пылевыми частицами, особенности накопления БАВ в растениях в различных экологических условиях, что позволило корректно определить и сформулировать цель и задачи исследования.

Работа базируется на достаточном числе экспериментальных данных, полученных в течение 7 лет исследования. Она содержит большое количество иллюстративного материала, что делает наглядными и доказательными представленные диссертантом выводы. Правильность сделанных заключений обеспечивается результатами статистической обработки данных. Материал изложен логично, сформулированные выводы и практические рекомендации аргументированы, достоверны и убедительны.

Новизна исследований диссертанта заключается в выявлении особенностей накопления экотоксикантов и БАВ в лекарственных растениях, произрастающих в районах с различной степенью загрязнения окружающей среды. Автором работы исследована взаимосвязь между этими процессами аккумуляции БАВ и основных загрязнителей, а также установлена зависимость между содержанием экотоксикантов в почве и растениях. На примере Воронежской области в работе дана экологическая оценка состояния качества ЛРС на предмет загрязнения пылевыми частицами, тяжелыми металлами и мышьяком, пестицидами и радионуклидами, накопление основных групп БАВ, а также аккумуляции лекарственными растениями комплекса макро- и микроэлементов.

Новизна данного вектора работы подтверждается тремя свидетельствами о государственной регистрации базы данных «Загрязнение верхних слоев почв Воронежской области тяжелыми металлами, мышьяком, естественными и искусственными радионуклидами» (№2022620085, заявл. 27.12.2021, опубл. 12.01.2022), «Удельная активность естественных и искусственных радионуклидов в лекарственном растительном сырье Воронежской области» (№2022620086, заявл. 27.12.2021, опубл. 12.01.2022), «Содержание тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье Воронежской области» (№2022620084, заявл. 27.12.2021, опубл. 12.01.2022).

Большое внимание в работе уделено новым методикам ультразвуковой экстракции и количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях одуванчика лекарственного, листьях подорожника большого, корнях лопуха большого, которые позволяют сократить время извлечения биологически активных веществ и повысить их выход на 8-10%. Автором предложен подход к разработке данных методик на основе регрессионного, дисперсионного и корреляционного методов математического анализа. Разработанные и валидированные методики ультразвуковой экстракции и количественного определения водорастворимых полисахаридов листьев подорожника большого, корней одуванчика

лекарственного, корней лопуха большого легли в основу предложенных дополнений к ФС на соответствующие виды ЛРС (ФС.2.5.0025.15 «Лопуха корни», ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листья», ФС.2.5.0086.18 «Одуванчика лекарственного корни»).

Новизна проведенных исследований также подтверждается патентами на изобретения (№2604934 «Способ получения водорастворимых полисахаридов из корней лопуха большого», №2635996 «Способ получения водорастворимых полисахаридов из корней одуванчика лекарственного», №2530501 «Способ получения водорастворимых полисахаридов из листьев подорожника большого», №2712554 «Способ получения инулина из растительного сырья», №2765503 «Способ получения инулина из лекарственного растительного сырья»).

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Научная и практическая значимость исследований Дьяковой Н.А. не вызывает сомнений, так как диссертантом проведен широкий круг исследовательских работ, набран и переработан обширный материал, решены важные задачи, в частности:

- проанализировано содержание тяжелых металлов и мышьяка, в образцах верхних слоев почв и ЛРС естественных и антропогенных экотопов Воронежской области;
- определены объекты хозяйственной деятельности региона, влияющие на загрязнение ЛРС экотоксикантами;
- выявлены способности изучаемых видов ЛРС к аккумуляции тяжелых металлов и мышьяка;
- выявлен характер загрязнения пестицидами верхних слоев почв и ЛРС агроценозов Воронежской области;
- изучены особенности загрязнения радионуклидами, естественными и техногенными, верхних слоев почв и ЛРС региона, закономерности перехода их в различные части и органы лекарственных растений;
- предложены подходы к нормированию природных радионуклидов в ЛРС;
- разработаны и валидированы методики количественного анализа водорастворимых полисахаридов, определяемых гравиметрическим методом в корнях одуванчика лекарственного, корнях лопуха большого, листьях подорожника большого;
- проведен фармакогностический анализ образцов ЛРС, отобранных в различных естественных и антропогенных экотопах региона, включающий количественное определение основных групп БАВ;
- выявлены особенности накопления лекарственными растениями основных экотоксикантов и БАВ в различных в экологическом плане условиях, установлены корреляционные связи между содержанием экотоксикантов и накоплением БАВ в ЛРС;
- исследован элементный состав изучаемых видов ЛРС, особенности экстракции макро- и микроэлементов в водные извлечения (настои и отвары) и трассредового их перехода по цепи «верхние слои почвы - ЛРС – лекарственный растительный препарат»;
- определены допустимые для заготовки ЛРС расстояния от транспортных магистралей на примере Воронежской области;

- разработан методологический подход к проведению региональной эколого-фармакогностической оценки качества ЛРС.

Полученные диссертантом данные можно использовать как мониторинговые комплексные исследования почв и растительного сырья в Воронежской области, позволившие выявить экологически «чистые» и загрязненные территории и обосновать выбор территорий, пригодных для заготовки ЛРС.

Диссертантом разработаны экспрессные методики получения и количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, корнях одуванчика лекарственного и корнях лопуха большого, отличающиеся меньшей продолжительностью во времени и большей точностью по сравнению с ранее предложенными методиками. Разработанные методики, при их реализации в технологическом процессе, могут способствовать повышению выхода полисахаридной фракции и других БАВ из ЛРС.

Н.А. Дьяковой выявлена необходимость в уточнении и сделана попытка усовершенствования фармакопейных статей ОФС.1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье», ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов», ФС.2.5.0025.15 «Лопуха корни», ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листья», ФС.2.5.0086.18 «Одуванчика лекарственного корни». Подготовлены и внедрены в практическую работу и учебную деятельность «Методические рекомендации по заготовке лекарственного растительного сырья в Воронежской области».

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты исследования, приведенные в диссертации, соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, в частности:

п. 2. Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.

п. 3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

п. 5. Изучение вопросов рационального использования ресурсов ЛРС с учетом влияния различных факторов на накопление БАВ в сырье.

п. 6. Изучение химического состава ЛРС, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества ЛРС и лекарственных форм на его основе.

п. 7. Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества ЛРС и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в ЛРС и лекарственных растительных средствах.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Основные положения диссертационной работы апробированы более, чем на 50 всероссийских и международных научно-практических конференциях и форумах. Наиболее значимые результаты опубликованы в 62 научных работах, в том числе в 30 статьях в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки

России; 20 статьях в изданиях, индексируемых в международных базах данных, 5 патентах на изобретения, 3 свидетельствах о государственной регистрации базы данных, 1 свидетельстве о государственной регистрации программы для ЭВМ, 2 монографиях, 1 методических рекомендациях.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертация включает введение, 7 глав, заключение, выводы, список литературы и приложения, Основная часть работы изложена на 296 страницах машинописного текста. Список литературы включает 483 источника, из них 120 иностранных. Общий объем диссертации с приложениями составляет 452 страницы, работа хорошо иллюстрирована, содержит 381 рисунок и 116 таблиц.

Во введении диссертации обоснована актуальность темы исследования, степень ее разработанности, сформулированы цель, задачи, положения, выносимые на защиту, и приведены сведения о структуре и объеме работы, а также результаты апробации результатов диссертационного исследования.

В первой главе традиционно рассматриваются существующие научные наработки по данной проблематике, изучены литературные данные по особенностям загрязнения ЛРС наиболее опасными экотоксикантами (тяжелыми металлами и мышьяком, пестицидами, радионуклидами) и их влиянию на накопление основных БАВ.

Во второй главе описаны места отбора образцов верхних слоев почв и ЛРС в рамках Воронежской области. Диссертантом дана географическая и экологическая характеристика всех точек отбора образцов, каждая из которых подвержена определяющему влиянию одного объекта хозяйственного пользования. Автором проанализированы возможные механизмы загрязняющего действия на почву и растительные ресурсы каждого из объектов хозяйственного пользования. Описаны объекты и методы исследования. Приведены данные о заготовке, условиях сушки и хранения образцов ЛРС, дано описание методов исследования верхних слоев почв, ЛРС и препаратов на их основе.

В третьей главе автором приводятся результаты исследований полного элементного комплекса изучаемых видов ЛРС, изучение минерального комплекса заготовленных образцов ЛРС, а также данные по загрязнению верхних слоев почв и растительных объектов тяжелыми металлами и мышьяком. Автором на основании проведенного исследования выявлены территории наибольшего загрязнения поллютантами и экологически благополучные районы. Методами математико-статистической обработки с использованием критерия Кохрена диссертантом подтверждена однородность, согласованность и достоверность полученных экспериментальных данных, а также прямая зависимость накопления тяжелых металлов и мышьяка в изученных образцах ЛРС от содержания элементов в верхних слоях почв территорий их произрастания. В результате проведенных исследований показано, что при увеличении концентрации всех определяемых тяжелых металлов и мышьяка в почве возрастало их содержание в растительном сырье, при этом степень перехода имеет тенденцию к снижению по мере увеличения концентрации элемента в почве. Изучены особенности накопления различных элементов в изучаемых видах ЛРС. Определены кларки тяжелых металлов и мышьяка в растениях синантропной флоры Воронежской области. Показано, что при анализе элементного состава ЛРС региона лимитирующим показателем явилось содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной

кислоте, на основании которого рекомендованы допустимые для сбора ЛРС расстояния от транспортных магистралей различной степени загруженности в разных природных зонах.

В четвертой главе приведены исследования по загрязнению отобранных на изучаемых территориях образцов почв и ЛРС природными (калий-40, торий-232, радий-226) и техногенными (цезий-137, стронций-90) радионуклидами. Выявлено, что значения удельной активности природных и естественных радионуклидов образцах ЛРС и верхних слоев почв Воронежской области отличаются относительной равномерностью распределения по изучаемым районам заготовки. Рассчитанные автором коэффициенты накопления наглядно показали неравномерность распределения радионуклидов в различных органах растений. Выявлено, что в целом наибольшей аккумулялирующей способностью природных и искусственных радионуклидов обладают листья подорожника большого, крапивы двудомной и корни одуванчика лекарственного, лопуха большого. На основе корреляционного анализа показано наличие тесной взаимосвязи между удельной активностью радионуклидов в верхних слоях почв и ЛРС, что подтвердило преимущественное радионуклидное загрязнение растительного сырья через почву. Полученные результаты статистически проверены по критериям Кохрена, которые подтвердили согласованность, достоверность и однородность результатов эксперимента. Закономерности миграции радионуклидов из почвы в ЛРС описаны математическими зависимостями с максимальными коэффициентами достоверности аппроксимации.

В пятой главе обсуждаются результаты исследований по загрязнению верхних слоев почв и лекарственного сырья хлорорганическими пестицидами. Во всех изучаемых образцах почв и растительного сырья агроценозов Воронежской области наличие ГХЦГ и его изомеров, ДДТ и его метаболитов, алдрин и гептахлора не выявлено. На основании проведенных исследований автором сделан вывод о полном экологическом благополучии почв агроценозов региона, а также растений, на них произрастающих, в отношении загрязнения хлорорганическими пестицидами. Показано, что результаты исследования выгодно отличают анализируемый регион от других субъектов РФ, где периодически выявляются высокие концентрации наиболее токсичных пестицидов, как в почве, так и в растительных объектах, что создает хорошие перспективы для культивирования лекарственных растений в Воронежской области.

В шестой главе обсуждаются результаты исследований по содержанию основных групп БАВ в ЛРС, заготовленной в Воронежской области. С применением регрессионного, дисперсионного и корреляционного анализов автором валидированы разработанные новые методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, корнях одуванчика лекарственного и корнях лопуха большого, которые позволяют значительно сократить продолжительность испытания. На примере исследованных образцов ЛРС автором показаны некоторые особенности содержания полифенольных соединений, накопление которых отличается значительной вариабельностью в зависимости от места заготовки. В образцах ЛРС, собранных в условиях агроценозов и ряда урбоценозов, автором выявлена индукция накопления флавоноидов по сравнению с образцами контрольных территорий, что можно объясняется диссертантом активацией в условиях антропогенной нагрузки ключевых ферментов биосинтеза флавоноидов, имеющих выраженную стресс-

индуцибельность. При этом, образцы, собранные в условиях значительного антропогенного воздействия (преимущественно заготовленные вблизи автотрасс, железнодорожной магистрали, промышленных предприятий, на улицах городов), отличаются относительно сниженным содержанием флавоноидных соединений, что, объяснено чрезмерным загрязнением окружающей среды, которое выходит за пределы выносливости видов и вызывает угнетение в них ферментных систем. Сходная вариабельность числовых показателей выявлена для более низкомолекулярных антиоксидантных веществ – оксикоричных кислот в листьях крапивы двудомной. Содержание эфирного масла в травах полыни горькой и тысячелистника обыкновенного в образцах контрольных территорий и агроценозов, в целом, более высокое, чем в образцах урбаноценозов. Содержание полисахаридов в пересчете на фруктозу в корнях лопуха большого, а также восстанавливающих сахаров в составе полисахаридов в пересчете на глюкозу в цветках липы сердцевидной отличалось более высокими значениями в образцах, заготовленных в условиях контрольных территорий и агроценозов. В ЛРС урбаноценозов концентрация гексоз несколько снижалась, достигая минимальных значений в образцах, собранных на улицах городов, вдоль автомобильных и железнодорожных магистралей, вблизи промышленных предприятий, что позволяет сделать вывод об отрицательном влиянии антропогенной нагрузки на получаемые результаты определения данных БАВ. Концентрация гравиметрически определяемых водорастворимых полисахаридов меньше варьировала в зависимости от экологических особенностей места произрастания листьев подорожника большого, корней одуванчика лекарственного, лопуха большого, при этом отмечено некоторое преобладание данной группы БАВ в образцах заповедных территорий. Автором подтверждено общее индуцирующее влияние небольших концентраций тяжелых металлов и мышьяка на накопление вторичных метаболитов в ЛРС. При этом показано, что в высоком содержании данные элементы способны подавлять накопление всех исследованных групп БАВ.

В седьмой главе рассмотрены особенности перехода спектра макро- и микроэлементов в водные извлечения (настои и отвары) на основе изучаемых видов ЛРС. Закономерности экстракции всех элементов описаны математически.

В восьмой главе на основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований предложена схема методологического подхода к проведению региональной эколого-фармакогностической оценки качества ЛРС, которая может быть применена или взята за основу в исследовании растительных ресурсов других субъектов Российской Федерации.

Общие выводы диссертации полностью отражают полученные результаты и соответствуют задачам исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью отражает текст и соответствует общим выводам диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация Дьяковой Н.А. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой решена актуальная научно-практическая задача, заключающаяся в проведении на примере Воронежской области комплексной

эколого-фармакогностической оценки качества ЛРСс учетом особенностей и закономерностей накопления в нем экотоксикантов и БАВ для выбора территорий возможной заготовки.

Исследование оформлено в соответствии с требованиями ВАК РФ, предъявляемыми к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Работа оформлена аккуратно, изложена хорошим профессиональным языком, иллюстрирована качественными рисунками, графиками и таблицами.

При анализе работы возникли некоторые вопросы и замечания:

1. В связи со значительной географическим полиморфизмом изучаемых видов лекарственных растений возникает вопрос об обоснованности и однозначности предлагаемых изменений в разделы фармакопейных статей ОФС.1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье», ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов», ФС.2.5.0025.15 «Лопуха корни», ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листья», ФС.2.5.0086.18 «Одуванчика лекарственного корни», т.к. предлагаемые границы признаков для отбора качественного сырья могут быть различны в разных регионах. Поэтому обоснование внесения изменений в разделы фармакопейной статьи требует дальнейшей экспериментальной проверки в других областях РФ.

2. В качестве объектов исследования автором преимущественного выбраны виды ЛРС от травянистых производящих растений. Исключением является один вид сырья от древесной жизненной формы - цветки липы сердцевидной. Поэтому результаты, полученные по данному виду сырья, не вполне корректно сравнивать с таковыми для остальных исследуемыми видов ЛРС в силу значительных отличий в длине корневой системы, строении и особенностях проводящей системы производящего растения, его размерами и др.

3. С чем автор связывает столь широкий разброс значений трансредового перехода макро- и микроэлементов в водные извлечения (настои и отвары)?

4. Как, по мнению автора, количественно изменятся показатели «Зола общая» и «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» для наземных видов лекарственного растительного сырья в случае его заготовки после выпадения осадков? Например, листья подорожника рекомендовано заготавливать именно после дождя, когда они просохнут, в это время они еще не успеют покрыться пылевым налетом.

5. В проведенном исследовании большое внимание уделено вопросам накопления в лекарственном растительном сырье тяжелых металлов и мышьяка, а также загрязнению различных частей растений неорганическими минеральными примесей (пылевыми частицами). В связи с этим возникает вопрос – изучался ли химический состав пылевого налета? Может ли быть так, что тяжелые металлы осаждаются вместе с пылевыми частицами исключительно на поверхности наземных частей и органов растений, и не участвуют в метаболизме растительных организмов?

В тексте диссертационной работы встречаются опечатки и стилистические недостатки, которых в целом немного и они не влияют на общее положительное впечатление. Обнаружено также несколько оформленных не по ГОСТу источников литературы в разделе «Список литературы» (например, №47, 356, 358, 446, 448, 450 и др.).

Необходимо отметить, что сделанные замечания и выявленные недостатки не влияют на высокую положительную оценку выполненной работы, не ставят под сомнение основные выводы, не снижают ценность и значимость диссертации и могут быть учтены автором в дальнейших исследованиях.

Заключение

Диссертационная работа Дьяковой Нины Алексеевны на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование эколого-фармакогностической оценки качества лекарственного растительного сырья (на примере Воронежской области)» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой решена крупная научная проблема комплексной региональной оценки эколого-фармакогностического качества ЛРС, выявлен ряд закономерностей влияния экотоксикантов на накопление природных БАВ, что имеет важное теоретическое и научно-прикладное значение для фармации и народного хозяйства.

По актуальности, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, диссертационная работа соответствует требованиям п. 15 Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Дьякова Нина Алексеевна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Главный научный сотрудник
отдела химии природных соединений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
(ФГБНУ ВИЛАР, 117216, г. Москва, ул. Грина, д. 7, тел: +7(495)3885509,
e-mail: vilarnii@mail.ru)
доктор фармацевтических наук
(специальность 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия
(15.00.02 - фармацевтическая химия и фармакогнозия)),
профессор РАН

Зилфикаров Ифрат Назимович

«28» декабря 2022 г.

Подпись И.Н. Зилфикарова заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ ВИЛАР,
кандидат фармацевтических наук



О.А. Семкина