

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования**

**«Пермская государственная  
фармацевтическая академия»**

**Министерства здравоохранения  
Российской Федерации**

(ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)

Юридический адрес: ул. Екатерининская, д.101,  
г. Пермь, 614990

Почтовый адрес: ул. Полевая, д.2, г. Пермь, 614990

Тел/факс (342) 233-55-01; 236-90-50;

E-mail: [perm@pfa.ru](mailto:perm@pfa.ru); <http://www.pfa.ru>

ИНН 5902291011; КПП 590201001

**«У Т В Е Р Ж Д А Ю»**

**Ректор**

федерального государственного  
бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Пермская государственная  
фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
кандидат биологических наук,  
доцент

В.Г. Лужанин,



«19» марта 2024 г.

19 МАР 2024 № \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

о научно-практической значимости диссертационной работы Вишнякова Евгения Владимировича на тему «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения», представленной в диссертационный совет 21.2.063.01, созданный на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**Актуальность темы исследования.** Как показывает анализ литературных источников, синергизм металла и фенольного соединения в одной молекуле может приводить к появлению новых фармакологических эффектов, усилению уже имеющихся видов активности и изменению физико-химических свойств лиганда-предшественника.

Анализ научных публикаций указывает на разрозненный характер синтеза изучаемых соединений. Исходя из этого, важным направлением является создание определённого алгоритма, который позволит получать металло-фенольные комплексы с высоким выходом и возможностью трансфера методологии на разные классы фенолов и металлы. Стоит отметить и перспективность исследования нативных минеральных комплексов металлов с биологически активными веществами (БАВ) растительного происхождения, так как растения способны аккумулировать как фенолы, так и катионы металлов. В ходе экстракции возможно взаимодействие двух компонентов комплекса (лиганда и комплексообразователя), что может предопределять сочетанное фармакологическое действие извлечения из растительного сырья.

Важной задачей является также оценка структуры комплексов. Для большинства синтезированных молекул реализуются различные физико-химические методы, позволяющие определить сайты связывания, соотношение компонентов и др. Исходя из структуры комплексов, можно спрогнозировать физико-химические свойства, виды активности и подобрать методы для контроля качества.

Комплексы находят своё применение в лёгкой и текстильной промышленности. За счёт наличия у них флуоресцирующих свойств, некоторые лиганды фенольной природы (например, флавоноиды) могут применяться с целью обнаружения элементных примесей (металлов) в лекарственных средствах.

В этой связи, тема исследования, послужившая основой для диссертационной работы Вишнякова Евгения Владимировича, имеет доказанную актуальность, так как посвящена вопросам теоретического и экспериментального обоснования синтеза, оценки структуры и биологической активности металло-фенольных комплексов.

#### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов**

Впервые было оценено растительное сырьё, обладающее противодиабетической активностью (побеги черники обыкновенной и

створки фасоли обыкновенной), с точки зрения накопления макро-, микроэлементов (комплексообразователей) и фенольных соединений (лигандов), выступающих в качестве компонентов нативных минеральных комплексов. Хроматографический скрининг показал наличие в обоих растениях флавоноидов (рутина, гиперозида); фенилпропаноидов (у черники обыкновенной побегов – хлорогеновой, п-кумаровой, протокатеховой, коричной, синаповой кислот, у створок фасоли – хлорогеновой и п-кумаровой кислот), органических кислот (у черники – яблочной, винной, янтарной кислот, у фасоли – яблочной кислоты). Также спектральными и титриметрическими методами было определено содержание флавоноидов, гидроксикоричных и органических кислот. Эти данные позволили рассчитать оптимальное количество комплексообразователя (цинка хлорида) с целью проведения предварительного скринингового исследования противодиабетической активности нативных и синтетических металло-фенольных комплексов.

Впервые был предложен унифицированный алгоритм синтеза комплексов, который нашёл своё отражение в Дереве принятия решений. Этот подход учитывает физико-химические свойства компонентов, условия синтеза. В ходе его реализации возможно получать искомые соединения с высоким выходом и малыми экономическими издержками. Важно отметить и то, что представленный алгоритм можно «переложить» на разные классы фенолов и катионы металлов. В диссертационной работе апробировано Дерево принятия решений на четырёх лигандах (рутин, кверцетин, хлорогеновая кислота, ресвератрол) и трёх комплексообразователях (цинк, кобальт, марганец). Показано, что за счёт слабых кислотных свойств ресвератрол не способен образовывать устойчивые комплексы с предложенными металлами. Следовательно, в ходе выполнения исследования было получено девять комплексов, для которых современными физико-химическими методами были оценены структурные характеристики (сайты связывания).

Впервые проведена оценка противодиабетической активности нативных и синтетических комплексов в экспериментах *in vivo*. Была

показана перспективность дальнейшего исследования данных соединений как потенциально нового класса лекарственных средств, обладающих гипогликемической активностью.

Возможность практического приложения получения комплексов металла и фенольного соединения показана на примере предложенной альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида. Модификация методики заключается в использовании в качестве лиганда рутина (вместо 8-гидроксихинолина), замене токсичного растворителя хлороформа на этиловый спирт, что в совокупности повышает экспрессность и эргономичность фармакопейного подхода.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационная работа создаёт предпосылки для дальнейшего изучения нативных минеральных комплексов, оценки их содержания и динамики накопления в зависимости от вида растения, условия произрастания и агротехнических условий.

Созданный алгоритм получения комплексов позволяет осуществить синтез соединений с возможностью расширения и трансферирования методологии на разные классы фенолов и металлы. Особенно интересно оценить состоятельность алгоритма на таких металлах как платина, ванадий, германий, золото, палладий и др.

Комплексы цинка, марганца и кобальта с рутином, кверцетином и хлорогеновой кислотой, полученные в ходе исследования в перспективе можно изучать *in vitro*, а в дальнейшем и *in vivo* с целью подтверждения данных по фармакологической эффективности, полученных в экспериментах *in silico* и литературных источниках.

Работа показывает, что за счёт способности ряда комплексов к флуоресценции (по аналогии комплекса алюминия и рутина) возможно расширить пул лигандов, с помощью которых определять примеси различных металлов, например, в фармацевтических субстанциях или пищевых продуктах.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую деятельность кафедр химико-фармацевтических дисциплин Школы фармации Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (акт внедрения от 06 декабря 2023 г.), кафедры химической технологии лекарственных веществ Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (акты внедрения от 09 января 2024 г.), Воронежского государственного университета (акт внедрения от 08 декабря 2023 г.) и нашли практическое применение в лабораториях ООО «Центр фармацевтической аналитики» (акт внедрения от 20 июня 2023 г.), Северо-Западного центра по контролю качества лекарственных средств (акт внедрения от 29 ноября 2023 г.) и АО «Фирма Медполимер» (акт внедрения от 29 декабря 2023 г.).

#### **Соответствие содержания диссертации заявленной научной специальности**

Основные положения диссертации Вишнякова Евгения Владимировича, выносимые на защиту, и выводы по диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 1 – Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ; пункту 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

#### **Степень обоснованности и достоверности полученных результатов, выводов и практических рекомендаций**

Материалы диссертационной работы дают возможность заключить, что методы исследования выбраны логично в соответствии с поставленными задачами. Достоверность обусловлена достаточным количеством экспериментальных исследований, использованием репрезентативных выборок и применением методических подходов, отвечающих поставленным задачам исследования. Экспериментальная часть работы выполнена с

использованием современных аналитических методов на поверенном оборудовании.

Фитохимический скрининг растительного сырья, обладающего гипогликемическим действием, был проведен с применением таких классических и современных физико-химических методов анализа, как хроматография (ВЭТСХ), спектрофотометрия в УФ- и видимой областях спектра, атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП), кислотно-основное титрование.

В работе применялись методологические подходы эксперимента, связанного с получением комплексных соединений. Для определения соотношения компонентов использовали метод Джоба (метод множественных вариаций), константы устойчивости устанавливали потенциометрически (метод Бьеррума). С целью доказательства структуры комплексов использовались УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, РФА. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами математической статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Оценка антиоксидантной активности комплексов и лигандов осуществлялась спектрофлуориметрическим методом. Противодиабетическая активность нативных (растительных) и синтезируемых комплексов исследовалась на модели дексаметазон-индуцированного сахарного диабета *in vivo* с участием белых крыс-самцов. Комплексы цинка с рутином и кверцетином также участвовали в эксперименте с применением генно-модифицированных мышей *C57BL/KsJ-db/db*. Статистическую обработку результатов биологического эксперимента проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0, США. Проверку нормальности распределения количественных признаков осуществляли с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Значимость различий между двумя выборками при нормальном распределении количественных признаков оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, при ненормальном — с помощью U-теста Манна-Уитни. Значимость различий между тремя

выборками при нормальном распределении количественных признаков оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса.

Разработка и валидация альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида проводилась согласно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик».

Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных конференциях различного уровня.

### **Публикации**

По теме диссертационной работы было опубликовано 12 печатных работ, из которых 2 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, индексируемом в наукометрической базе данных Scopus, и 9 тезисов.

### **Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, выводов и заключений**

Диссертационная работа Вишнякова Евгения Владимировича характеризуется последовательностью и логичностью изложения, целостностью данных, а также направленностью исследований на решение поставленных задач.

Диссертационная работа изложена на 145 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 22 рисунками и 35 таблицами. Структура работы состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 экспериментальных глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 11 приложений. Библиография включает 129 ссылок на литературные источники, в том числе 119 ссылок на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность работы, показана степень её разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, отражена

научная новизна, практическая значимость работы, представлена методология исследования, описан личный вклад автора, сформулированы положения, выносимые на защиту, приведены данные об апробации результатов работы и информация о публикациях по теме диссертации.

В первой главе автор представил результаты анализа литературных данных о подходах к синтезу металло-фенольных комплексов, оценки их структуры. Показана перспективность применения данных молекул в качестве лекарственных средств для лечения социально-значимых заболеваний. Отмечено, что металло-фенольные комплексы можно опосредованно использовать для определения суммы БАВ в ЛРС, контроля содержания примесей металлов.

Во второй главе автор представил сведения об объектах исследования, используемом оборудовании и реактивах, методиках анализа, дизайнах биологических экспериментов.

В третьей главе изложены результаты фитохимического исследования черники обыкновенной побегов и фасоли обыкновенной створок, обладающих противодиабетической активностью с целью определения основных групп БАВ-потенциальных лигандов. Методом АЭС установили макро- и микроэлементный профиль растений. Данные по количественному содержанию основных групп БАВ легли в основу для скринингового противодиабетического исследования *in vivo*.

В четвертой главе автор представил унифицированный алгоритм синтеза металло-фенольных комплексов, с помощью которого были получены соединения цинка, марганца и кобальта с рутином, кверцетином и хлорогеновой кислотой, рассчитаны и статистически обработаны выходы. Были представлены данные по определению соотношения компонентов, устойчивости и оценки структуры комплексов с помощью спектроскопии в видимой и УФ областях, ИК-спектроскопии, ЯМР спектроскопии, масс-спектроскопии, РФА, определены сайты связывания, описаны физико-химические свойства.

В пятой главе приведена информация об оценке антиоксидантной активности комплексов и соответствующих лигандов. Получены данные о



положительном влиянии нативных и синтетических минеральных комплексов на течение заболевания сахарного диабета 2 типа в экспериментах *in vivo*. В эксперименте на мышах линии *C57BL/KsJ-db/db* было показано, что комплекс цинка с рутином положительно влияет на течение сахарного диабета II типа за счёт увеличения содержания в крови адипонектина в 2,4 раза и лептина в 2,5 раза относительно контроля. В главе также представлена разработка и валидация альтернативной методики спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида, которая отличается экспрессностью и эргономичностью по сравнению с подходом, приведённым в ГФ РФ XV.

В Заключении отражены основные результаты диссертационной работы, весомые научные и практические результаты. Они сформулированы четко и согласуются с целью и задачами исследования, соответствуют основным положениям, выносимым на защиту.

Приложения содержат акты внедрения исследований в практическую деятельность и учебный процесс, сводную таблицу с данными о структурах комплексов, расчет дозировок и результаты предварительного исследования противодиабетического действия комплекса рутина с цинком, Дерево принятия решений, диаграммы определения соотношения компонентов в комплексах, иллюстрационные материалы (спектры).

Последовательность изложения и содержание материала в диссертации и автореферате совпадают.

Отмечается завершенность исследования и решение задач в полном объеме на достаточно высоком научно-методическом уровне.

### **Конкретный личный вклад автора в получение результатов диссертации**

Вишняковым Е.В. совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. И.И. Тернинко были определены основные векторы исследовательской работы, сформулирована цель и спланированы задачи для её достижения. Литературный поиск, анализ и систематизацию данных научных публикаций Вишняков Е.В. осуществлял самостоятельно. Автором лично был произведен весь объем экспериментальных работ, осуществлена интерпретация и

статистическая обработка полученных результатов, их оформление в виде научных публикаций.

Экспериментальные исследования (АЭС-ИСП, масс-спектрометрия, ИК-спектрометрия, спектрофлуориметрия, УФ спектрофотометрия) проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». Оценка противодиабетической активности осуществлялась в Центре экспериментальной фармакологии ФГОУ ВО СПХФУ Минздрава России. ЯМР анализ проводили на базе парка научно-технического оборудования СПбГУ им. Петра Великого. Личный вклад автора составил не менее 90%.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Достоинством диссертационной работы является комплексный последовательный подход в проведении исследования, обосновании используемых методик и анализе полученных результатов. В ходе решения поставленных задач получены достоверные результаты, которые отражены в положениях, выносимых на защиту. Программа научных исследований выполнена в полном объеме.

В целом выполненное исследование оценивается положительно, однако при рассмотрении работы Вишнякова Е.В. возникли следующие *вопросы и замечания*:

1. Автор некорректно приводит названия объектов исследования, следует называть сначала родовое название, потом видовое, затем название сырья, например, Черники обыкновенной побегов.

2. На стр. 8 автореферата и 37 диссертации автор указывает, что «...по информации на упаковке сырье было заготовлено в Алтайском крае (г. Барнаул) в 2020 г...», на упаковке указывается адрес производителя, а не заготовки сырья. Для каждого объекта исследования не лишним было бы указать количество анализируемых упаковок сырья, номер серии, партии, назвать производителя.

3. В диссертации не указано международное непатентованное наименование (МНН) рутина – рутозид тригидрат. Вы изучали не тригидрат?

4. В диссертации на стр. 45 и в автореферате на стр.9 в общей методике синтеза комплексов указано, что выпавший в колбе осадок отфильтровывали с помощью установки для вакуумной фильтрации, промывали трёхкратно порциями метанола по 30 мл, собирали с фильтра и сушили в эксикаторе. Достаточно ли такой очистки? Проводили ли Вы перекристаллизацию полученных комплексов? Как контролировалось завершение реакции?

5. В автореферате на стр. 10 и в диссертационной работе на стр. 64 (Выводы, пункт 3) утверждается, что в исследуемом ЛРС преобладают ионы кальция, магния, марганца, алюминия и цинка. Почему же тогда Вы выбрали для изучения комплексы фенольных соединений не только с цинком и марганцем, но и с кобальтом, которого в Черники обыкновенной побегах и Фасоли обыкновенной створках достаточно мало согласно данных таблицы 20 (стр. 63)?

6. В диссертации на стр. 78 (рисунок 13) показано, что металлы формируют координационные связи с рутином по 3'-4' сайту. Почему не рассматривается в рутине возможность связывания металлов по спиртовым гидроксильным группам в остатке глюкозы и рамнозы по типу сахаратов (сахароза за счет спиртовых гидроксильных групп вступает в реакцию с ионами кобальта; ФС.2.1.0034.15 Сахароза, ГФ XIV, т. 3, стр. 4779)?

7. Каким образом автор соотносит сигналы протонов ОН- и СООН- групп лигандов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах с их положением в структурной формуле (таблица 27)?

8. На чем основан выбор метода определения антиоксидантной активности?

9. Насколько достоверно можно утверждать, что предложенный автором алгоритм синтеза металло-фенольных комплексов можно трансферировать на все классы фенольных соединений, экспериментально подтвердив это только на трех классах фенольных соединений, используя по одному представителю из данных классов.

10. На странице 49 диссертации отмечено, что проведенные исследования были согласованы биоэтической комиссией ФГБОУ ВО

СПХФУ Минздрава России, однако не указаны дата и номер протокола заседания комиссии.

11. В диссертационной работе на стр. 30 приведена неверная нумерация рутозида (рутина): не ...2-(4',5'-дигидроксифенил) ... 1-бензопиран-4-он, а ...2-(3',4'-дигидроксифенил) ... 1-бензопиран-4-он.

12. По тексту диссертации встречаются опечатки (стр. 9, 36, 56, 59), на страницах 49 и 50 один абзац повторяется 2 раза, в списке литературы источники 64 и 72 дублируют друг друга, во введении диссертации лучше использовать внутритекстовые библиографические ссылки на литературу.

Однако вышеперечисленные замечания и вопросы носят уточняющий характер, не снижают достоинства работы, и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

#### **Рекомендации по использованию результатов для науки и практики**

Результаты диссертационного исследования позволяют охарактеризовать комплексы металлов с фенольными соединениями растительного происхождения как новый перспективный класс лекарственных средств, направленных на терапию социально-значимых заболеваний, например, сахарного диабета 2 типа. В дальнейшем с учётом разработанного алгоритма синтеза комплексов можно масштабировать производство изучаемых соединений. Предлагаемый подход спектрофлуориметрического определения алюминия с помощью рутина является экспрессным, недорогим и экологичным. Исходя из этого, его можно рекомендовать с целью практического внедрения на предприятия, где контролируют содержания элементных примесей в лекарственных средствах. Это позволит снизить материальные и временные издержки, а также пагубное воздействие хлороформа на организм человека и окружающую среду.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Вишнякова Евгения Владимировича «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного

происхождения», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является самостоятельным законченным научным исследованием, имеет теоретическую и практическую значимость и содержит решение актуальной задачи современной фармацевтической отрасли по поиску и синтезу новых лекарственных средств на основе фенолов растительного происхождения и металлов.

По актуальности научного направления, научной новизне, методам решения поставленных задач, объему и уровню исследований, теоретической и практической значимости диссертация «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Вишняков Евгений Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв на диссертационную работу Вишнякова Евгения Владимировича «Синтез, установление структуры и скрининговая оценка биологической активности комплексов металлов с фенольными соединениями растительного происхождения», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, обсужден и одобрен на заседании кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская

государственная фармацевтическая академия» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации (протокол № 7 от 18.03.2024 г.).

Замараева Татьяна Михайловна  
Заведующий кафедрой фармацевтической химии  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Пермская государственная фармацевтическая  
академия» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, доктор химических наук (02.00.03 –  
Органическая химия), доцент

Подпись

Бобровская Ольга Васильевна  
Профессор кафедры фармацевтической химии  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Пермская государственная фармацевтическая  
академия» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, доктор фармацевтических наук (14.04.02 –  
Фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент

Подпись

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая  
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

614990, Российская Федерация, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2.  
+7 (342) 233-55-01  
perm@pfa.ru

Подпись д-ра хим. наук, доцента Замараевой Т.М. и д-ра фармацевт. наук,  
доцента Бобровской О.В. заверяю  
Начальник отдела кадров Рубцова Александра Владимировна  
«19» марта 2024 г.

