

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Ханиной Минисы Абдуллаевны на диссертационную работу Лужанина Владимира Геннадьевича на тему «Методология поиска перспективных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ 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 доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)

Актуальность темы исследования

В настоящее время наблюдается устойчивая тенденция к увеличению количества новых фитопрепаратов на фармацевтическом рынке, чему способствуют, прежде всего, высокое биохимическое разнообразие природных соединений и их широкая терапевтическая активность. Современные методы фармакологического скрининга *in silico* и *in vitro* активно используются исследователями и позволяют существенно сократить затраты на фармацевтическую разработку, обеспечить непрерывную поисковую научно-практическую работу, одновременно изучать природные вещества, относящиеся к различным химическим классам. Наличие современных методов физико-химического анализа позволяет проводить выделение индивидуальных соединений из сложных смесей технологично и эффективно, добиваясь высокой степени чистоты фармацевтических субстанций. Указанные факторы обеспечивают возможность осуществления эффективного направленного поиска биологически активных соединений и их комплексов в растительных объектах.

Выделение индивидуальных соединений из суммарных растительных экстрактов, прогнозирование их фармакологической активности методами *in*

silico и подтверждение в экспериментах методами *in vitro* позволяют проводить современный скрининг перспективных для последующей фармацевтической разработки молекул, определять мишени и механизмы их действия, устанавливать основные фармакокинетические свойства и оценивать параметры безопасности.

Методология разработки новых фитопрепаратов предполагает использование алгоритма комплексного исследования с применением различных современных методов анализа, позволяющего осуществить обоснованный выбор целевых молекул-лидеров, имеющих высокий лекарственный потенциал. В современной литературе отсутствуют данные о системных подходах к выделению и исследованию индивидуальных веществ растительного происхождения, относящихся к классам полифенолов, конструировании теоретически обоснованных прогностических моделей их фармакологической активности *in silico* с последующим подтверждающим фармакологическим скринингом *in vitro*. Наличие воспроизводимых алгоритмов поиска, выделения и изучения индивидуальных веществ природного происхождения позволит осуществлять фармацевтическую разработку фитопрепаратов с высокой степенью доказательности и эффективности.

В связи с этим, диссертационная работа Лужанина Владимира Геннадьевича, посвященная разработке методологии поиска перспективных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения, представляется современной и актуальной.

Личный вклад автора

Структура диссертации, уровень рассматриваемой научной проблемы, сформулированные цель и задачи, основные результаты и выводы, положения, выносимые на защиту, отражают самостоятельную точку зрения автора. Лужанин В. Г. принимал активное участие в сборе и определении растительного сырья, выполнении работ по выделению и идентификации индивидуальных соединений, скрининге фармакологической активности,

обобщении и систематизации полученных результатов, формулировке основного алгоритма и принципов методологии. Лично автором написаны диссертационная работа и автореферат. Под руководством автора выполнены и успешно защищены три кандидатские диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки), 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 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.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Лужанина Владимира Геннадьевича имеет традиционную структуру и изложена на 388 страницах машинописного текста, содержит 29 рисунков и 45 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (5 глав), заключения, списка литературы, включающего 216 наименований (из них 171 иностранный источник) и 2 приложений.

Каждая глава представляет собой завершённый этап исследования, а заключения к главам отражают обобщённые наиболее значимые теоретические и практические результаты.

Во **введении** Лужанин В. Г. обосновал актуальность выбранной темы исследования, сформулировала цель и задачи, отразил научную новизну, теоретическую и практическую значимость, а также сформулировал положения, выносимые на защиту.

В главе 1 проведен обзор отечественной и зарубежной литературы, в котором подробно описаны существующие подходы к поиску перспективных молекул растительного происхождения, указаны преимущества и недостатки различных методов выделения индивидуальных веществ из природных источников, проанализированы различные методы фармакологического скрининга *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, в том числе в пределах актуальных задач по исследованию фармакологической эффективности индивидуальных соединений и их смесей. На основании данных изученной литературы Лужаниным В. Г. предложены критерии и обоснован выбор растительных объектов диссертационной работы, а также определены методы комплексного экспериментального исследования индивидуальных веществ, относящихся к группе фенольных соединений.

Глава 2 включает в себя описание материала исследования и оборудования, реактивов, растворителей и методов, используемых при выполнении диссертационной работы. В начале главы приведена таблица с указанием объектов исследования, а также места и условий их заготовки и сушки. Подробно приведены характеристики методов фитохимического анализа суммарных фракций и выделения индивидуальных соединений, их идентификации и фармакологического скрининга. Подробно описаны методы изучения влияния выделенных индивидуальных соединений на систему гемостаза человека и статистической обработки полученных данных.

В главе 3 представлены результаты выделения и исследования фенольных соединений из 5 различных объектов, представлены схема и описание общего подхода к выделению целевой группы веществ, а также методики выделения 38 индивидуальных соединений с указанием их физико-химических свойств. Глава также содержит таблицы с характеристиками ЯМР-спектров выделенных соединений их химическими формулами. Большое внимание уделено изучению 8 новых природных соединений, ранее не описанных в литературе.

Глава 4 содержит результаты исследования методами *in silico* и включает анализ данных компьютерного прогноза фармакологической активности молекул выделенных индивидуальных соединений, обоснование выбора модельной системы организма человека для последующих исследований методами *in vitro* и определения целевой группы лекарственных кандидатов.

Глава 5 содержит результаты фармакологического скрининга методами *in vitro* всех полученных экстрактов и индивидуальных соединений в отношении системы гемостаза человека. В главе также обоснован выбор наиболее перспективных веществ для последующей фармацевтической разработки, отдельное внимание уделено эксперименту по определению взаимного влияния наиболее активных в отношении системы гемостаза компонентов экстракта *Empetrum nigrum*.

Глава 6 содержит схему предлагаемой методологии исследования с описанием алгоритма всех последовательных этапов научного эксперимента. В главе также сформулированы основные принципы методологии, которые обуславливают теоретические и практические особенности проведения исследований, а также обеспечивают воспроизводимость результатов.

В **заключении** диссертационной работы сформулированы 7 основных результатов, которые соответствуют всем поставленным задачам диссертационного исследования. В **приложениях** представлен реестр индивидуальных соединений, сформированный из паспортов субстанций, а также акты внедрения и результаты интеллектуальной деятельности.

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

- впервые предложена методология поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения;

- впервые из надземных частей *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листьев *Rubus chamaemorus* выделены и

идентифицированы 38 индивидуальных соединений, 8 из которых являются новыми природными;

- впервые проведено компьютерное моделирование и осуществлен прогноз фармакологической активности молекул выделенных индивидуальных соединений растительного происхождения несколькими взаимно дополняющими программными продуктами *in silico*;

- впервые исследовано влияние суммарных экстрактов и растворов выделенных индивидуальных соединений на систему гемостаза человека в условиях *in vitro*, в результате чего установлены соединения-лидеры для последующей фармацевтической разработки;

- впервые изучено взаимное влияние соединений-лидеров при эквимолярном смешении при анализе фармакологической активности на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro*;

- получены 4 патента РФ на применение выделенных индивидуальных соединений в качестве средств, обладающих антиагрегационной активностью, и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

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

Обоснованность основных научных положений, выводов и практических рекомендаций научного исследования подтверждается достаточным объемом и квалификационным уровнем выполненного эксперимента, используемыми методами статистической обработки научных данных. Научные положения и выводы, сформулированные в работе, являются обоснованными, достоверными и полностью соответствуют поставленным задачам.

Теоретическая и практическая значимость, внедрение результатов исследования

В результате выполнения диссертационного исследования Лужаниным В. Г. разработан базовый алгоритм и сформулированы основные принципы

поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения. Важно отметить, что результаты исследований фармакологической активности *in vitro* на моделях системы гемостаза организма человека показали преимущественную эффективность индивидуальных веществ над их суммой в виде экстракта или эквимольных смесей. Полученный комплекс экспериментальных данных позволяет осуществлять эффективный и экономичный скрининг перспективных природных молекул, разрабатывать новые методики стандартизации лекарственного растительного сырья по содержанию индивидуальных веществ, разрабатывать промышленные регламенты по культивированию и заготовке лекарственного растительного сырья с высоким содержанием в нем целевых веществ, разрабатывать промышленные регламенты по выделению индивидуальных соединений из растительного сырья, методик их химического воспроизведения и модификации.

Сформирован реестр индивидуальных веществ фенольной природы, включающий 38 паспортов субстанций, которые содержат физико-химические характеристики веществ и данные компьютерного прогноза их фармакологической активности. Из 38 выделенных индивидуальных соединений определены 4 наиболее перспективных лекарственных кандидата с целью последующей фармацевтической разработки средств для лечения заболеваний сердечно-сосудистой и кровеносной систем: 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-(3-гидроксифенил)-этан; 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидро-фенантрен; 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон; 4-о- α -арабинофуранозилэллаговая кислота.

Методика выделения из растительного сырья индивидуальных веществ, обладающих лекарственным потенциалом и относящихся к производным бибензила, 9,10-дигидрофенантрена и дигидрохалконов, внедрена в учебный процесс ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г. Пермь) (акт от 30 августа 2023 г.). Разработанная методология поиска перспективных

лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения внедрена в научный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (г. Санкт-Петербург) (акт от 29 января 2024 г.). Алгоритм выбора перспективных для фармацевтической разработки молекул и их сочетаний на основе анализа результатов прогностического моделирования внедрен в производство АО «Фармпроект» (г. Санкт-Петербург) (акт от 14 ноября 2023 г.). Методика выделения индивидуальных производных С-гликозидов флавоноидов и ксантонов из травы *Iris lactea* внедрена в производство ООО «Тенториум» (г. Пермь) (акт от 25 января 2024 г.)

Апробация и публикации

Основные результаты работы представлены на Международных конгрессах «РНУТОРНАРМ» (Санкт-Петербург, 2016, 2019, 2023; Грац (Австрия), 2017; Хорген (Швейцария), 2018); XXII Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2017); Международных научно-методических конференциях «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2017, 2019; Пермь, 2023); Международной научной конференции «Перспективы лекарственного растениеводства» (Москва, 2018); Международных научно-практических конференциях «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2019, 2023); XVII Международной школе-конференции "Magnetic Resonance and its Applications Proceedings - SPINUS 2020» (Санкт-Петербург, 2020); Научно-практической конференции с международным участием «Создание новых лекарств – от идеи до производства» (Пермь, 2021); Научно-практических конференциях «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, 2021, 2023); Международных научно-практических конференциях «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2021, 2023); Международной научной конференции «От биохимии растений – к биохимии человека» (Москва, 2022); международной научно-практической конференции «Фармацевтическая

наука XXI века: актуальные проблемы и перспективы их решений» (Уфа, 2022); Научно-методических конференциях с международным участием «Сандеровские чтения» (Санкт-Петербург, 2023, 2024); Конгрессе «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» (Москва, 2023); Международной научной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях» (Москва, 2023).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 36 научных работ, среди которых 13 статей в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованный ВАК Минобрнауки России, а также 5 статей, индексируемых в наукометрической базе данных Scopus.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, в том числе в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020).

Рекомендации по использованию результатов исследования для науки и практики

Результаты работы Лужанина В. Г. рекомендуются к использованию в практике фармацевтического анализа и разработке современных фитопрепаратов, практике фитохимического анализа лекарственного растительного сырья и научного поиска новых природных соединений,

практике выделения и наработки индивидуальных соединений из растительных объектов.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Лужанина В. Г. выполнена на высоком научном и квалификационном уровне с применением самых современных методов исследования. Представленный материал оформлен в соответствии с требованиями государственных стандартов Российской Федерации, хорошо структурирован и иллюстрирован, текст изложен логично.

Несомненными достоинствами диссертационного исследования являются его теоретическая и практическая значимость, уровень апробации и внедрения, авторская доступная подача материала. Выполненные исследования хорошо спланированы, логичны и обоснованы в своей последовательности. Полученные результаты закономерны и полностью согласуются с поставленными задачами.

Диссертационная работа представляет собой полное и завершённое научное исследование. Однако, несмотря на общую положительную оценку работы, необходимо выделить следующие вопросы и замечания:

1. Насколько воспроизводима схема выделения индивидуальных соединений, представленная в диссертационной работе, для других химических классов?

2. В паспортах субстанций не указана температура плавления индивидуальных веществ. Каким образом подтверждалась их чистота?

3. Количество выделенных индивидуальных соединений из каждого объекта различное и варьирует от 3 до 17. Какие факторы на это влияют?

4. Известно, что химический состав надземной части и подземных органов растений зачастую значительно отличается. Чем обусловлен выбор в качестве объектов исследования именно надземных частей растений?

5. В разделе 3.2.2 Индивидуальные соединения n-гексановой фракции автор описывает получение n-гексановой фракции из ЛРС и дальнейшее ее исследование. Цит.: «Для избирательной экстракции неполярных соединений

10,0 г. измельченных и просеянных через сито с диаметром отверстий 1 мм побегов *Empetrum nigrum* экстрагировали 300 мл *n*-гексана». В результате из данной фракции было выделено 8 соединений (стр. 96).

В разделе 3.1 Разработка общих подходов к выделению индивидуальных соединений из растительного сырья приведена схема (рисунок 5), согласно которой *n*-гексановая фракция выделяется жидкость-жидкостной экстракцией этанольного экстракта ЛРС (стр 70). Вопрос – в базовом алгоритме поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения, разработанном автором, необходимо придерживаться предложенной схеме их выделения из ЛРС или есть отступления от этого правила? Если есть отступления, то чем они вызваны?

6. На стр. 71, 102, 112, 131 приведены ВЭЖХ хроматограммы суммарных экстрактов *Empetrum nigrum* (рис. 6), *Rubus chamaemorus* (рис. 10), *Rubus chamaemorus* (рис. 12), *Ononis arvensis* (рис. 15). Вопрос – с какой целью приведены хроматограммы, по данным хроматограммам можно судить о присутствии выделенных соединений?

7. В разделе 3.3 Индивидуальные соединения *Rubus chamaemorus* L. в методике выделения фракций из сгущенного этанольного экстракта, полученного из сырья морошки исключена стадия жидкость-жидкостной экстракции *n*-бутанолом. Исследовался только водный остаток, после экстракции органическими растворителями. Почему *n*-ксановая и дихлорметановая фракция не изучалась?

8. В заключении к Главе 5 автор отмечает, что активность ряда индивидуальных соединений в стандартной концентрации 1,0 мг/мл превосходит как антиагрегационную, так и антикоагуляционную активность суммарных экстрактов растений в аналогичной концентрации, из которых они были выделены. Это логично, ведь в суммарных экстрактах их концентрация меньше, чем в растворах индивидуальных веществ. В связи с этим вопрос – если концентрация веществ, проявивших антиагрегационную и

антикоагуляционную активность в экстрактах, была таковой как в их растворах отличалась бы их фармакологическая активность от растворов индивидуальных веществ?

9. Установлено, что эквимолярное смешение растворов кандидатов-лидеров приводит к снижению антиагрегационной и антикоагуляционной активности исследуемых растворов, но не приводит к изменению активности в отношении процессов активации тромбоцитов.

Вопрос - почему выбрано соединение индивидуальных веществ в эквимолярном смешении, а не в том соотношении в котором находятся в исходном экстракте, например, в *Empetrum nigrum*? Антиагрегационная и антикоагуляционная активности растворов кандидатов-лидеров при их эквимолярном смешении ниже или превосходят эти активности исходных экстрактов?

Замечания – ошибки технического характера (стр. 102, 152).

Следует отметить, что высказанные замечания носят уточняющий характер, не снижают научную и практическую значимость проведенных исследований и не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертационной работы Лужанина В. Г.

Заключение

Таким образом, диссертация Лужанина Владимира Геннадьевича на тему «Методология поиска перспективных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения», представленная на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой решена важная научная проблема, связанная с разработкой новых эффективных подходов к поиску и получению фармацевтических субстанций на основе индивидуальных соединений растительного происхождения, оценке их вклада в фармакологическую активность суммарных экстрактов.

По актуальности, методическому уровню, объему выполненных

исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного 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, от 25.01.2024 г. № 62), предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Лужанин Владимир Геннадьевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», доктор фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия), профессор

Ханина Миниса Абдуллаевна

29 мая 2024 г.

государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет»

Адрес: 142611, Российская Федерация, Московская область, г.Орехово-Зуево, ул.Зеленая, д. 22

тел.: раб. 8 (496) 425-78-88; моб. 8-915-481-54-60.

e-mail: khanina06@mail.ru

Подпись профессора М.А. Ханиной заверяю.

Проректор по научной инновационной деятельности государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет»,

Министерства образования Московской области

Кандидат филологических наук, доцент

Яковлева Элина Николаевна

