

ОТЗЫВ официального оппонента

доктора фармацевтических наук, профессора Егоровой Светланы Николаевны на диссертационную работу Липина Даниила Евгеньевича «Разработка технологии и стандартизация мягких лекарственных форм, содержащих фитостероиды *Serratula coronata* L.», представленную в диссертационный совет Д208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности: 14.04.01 – технология получения лекарств

Актуальность темы и ее связь с планами соответствующей отрасли науки. Фитостероиды (природные соединения, родственные по структуре и физиологическому действию гормону линьки насекомых – экизону) представляют значительный интерес в отношении создания новых лекарственных средств, поскольку сочетают широкий спектр фармакологической активности и низкую токсичность. Перспективным отечественным источником получения фитостероидов является растение серпуха венценосная (*Serratula coronata* L.). Научной школой д. биол. наук, профессора В. В. Володина в Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской Академии наук проведена работа по интродукции серпухи венценосной и запатентована технология выделения из ее листьев фитостероидной фракции «серпистен», содержащей не менее 75 % 20-гидроксиэкизона и не менее 10 % 25S-инокостерона. В Российской Федерации зарегистрированы БАД, содержащие в качестве активного ингредиента серпистен, для которых установлено противодиабетическое, адаптогенное, гастропротекторное, термопротекторное и антигипоксическое действие. Однако, несмотря на то, что комплекс изученных эффектов серпистена позволяет предположить наличие у него репаративного действия, к настоящему времени не разработаны лекарственные формы серпистена для местного применения, и в доступных научных источниках практически отсутствует информация о технологических исследованиях и методах стандартизации мягких лекарственных форм с фитостероидами. В работах А. Meybeck и Е. Пшунетлевой показана возможность включения фитостероидов в структуру липосом, которое приводит к усилению ранозаживляющего действия, а также к снижению частоты образования келоидных рубцов, однако требует решения проблема низкого включения фитостероидов во внутреннее пространство липосом.

В связи с указанным не вызывает сомнения актуальность для отечественной фармацевтической науки цели диссертации Д.Е.Липина - разработка составов, технологий и стандартизация мази и липосомального геля серпистена, обладающих регенерирующим действием.

Цель и задачи, поставленные в работе Липина Д. Е., соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств (пункты 2, 3 и 6).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и поддержана грантом программы «УМНИК».

Характеристика диссертации

Диссертационная работа Д.Е.Липина состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трёх глав собственных экспериментальных исследований, общих выводов, библиографического списка, включающего 180 источников (из них 82 зарубежных) и приложений. Работа изложена на 187 страницах, содержит 38 таблиц, 42 рисунка.

Первая глава диссертации представляет собой обзор литературы, в котором проводится обобщение материалов научных публикаций о структуре, спектре фармакологического действия фитоэкдистероидов. Приведены основные растительные источники выделения фитоэкдистероидов из дикорастущих и интродуцированных видов, а также возможность использования культуры тканей. Представлены методы выделения и очистки серпистена из растительного сырья. Дана характеристика фитосом – липосомальных структур, в которых образуется водородная или ковалентная связь между биологически активным веществом и фосфолипидом. В обзоре также рассмотрены современные технологические аспекты получения мягких лекарственных форм регенерирующего и противовоспалительного действия на основе природных биологически активных веществ. Обоснована целесообразность разработки технологии мягких лекарственных форм с серпистеном.

Во второй главе представлены сведения о материалах и методах экспериментальной части исследования. Даны показатели качества серпистена, методики проведения хроматографических и спектральных анализов.

Приведены основные технологические и биофармацевтические исследования мягких лекарственных форм.

Обработка экспериментальных данных проведена с использованием метода вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности Стьюдента $\leq 0,05$ по ГФ 12 издания.

В главе 3 диссертации представлены результаты исследований по разработке технологии и стандартизации мази серпистена. В разделах 3.1 – 3.3 описан подбор способа введения субстанции серпистена в мазевую основу и выбор составов композиций для предварительных исследований. Проведены реологические исследования, а также оценка коллоидной и термической стабильности. В ходе изучения высвобождения серпистена из мазевых композиций выбрана композиция мази серпистена дифильной природы, для которой в разделе 3.4 описана проведенная оптимизация по параметрам: стабильность мазевой композиции, скорость высвобождения серпистена из мази в агаровый гель, рН водной вытяжки и кислотное число. В результате проведенной работы обоснован состав мази серпистена, ее технологическая схема получения подробно описана в разделе 3.5. В последующих двух разделах описана методика обнаружения серпистена в мази и его количественного определения. Показано, что использование в качестве экстрагента воды очищенной, подогретой до 60 °С, и технологического приема двойной экстракции приводит к 98,85 % открываемости серпистена. Проведена валидация предложенной методики количественного определения и установлена стабильность мазевой композиции серпистена в течение двух лет при температуре хранения (12-15) °С.

Следующий раздел работы Д. Е. Липина (**глава 4**) посвящен обоснованию состава и разработке технологии липосомального геля с серпистеном.

В разделах 4.1–4.3 для выбора состава малых однослойных липосом с серпистеном проведены предварительные экспериментальные исследования по изучению влияния природы буферного раствора и уплотнителя стенки липосом на средний размер частиц, дзета-потенциал и индекс полидисперсности суспензии «пустых» малых однослойных липосом. Наиболее стабильные результаты получаются в случае использования фосфатного буферного раствора с рН=6,4. В разделах 4.4–4.8 отражены результаты исследований суспензии малых однослойных липосом с серпистеном. Автором для получения больших мультиламеллярных липосом использован метод гидратации тонкой

липидной пленки, как наиболее предпочтительный для водорастворимых соединений. Подобранный режим получения тонкой липидной пленки позволяет добиться полного удаления летучих органических растворителей, что подтверждается при помощи газовой хроматографии. При оценке суспензии малых однослойных липосом, полученных на стадии гомогенизации, выяснилось, что наименьшим диаметром частиц и индексом полидисперсности, а также наибольшим значением дзета-потенциала обладает состав липосом, куда в качестве уплотнителя липидной стенки включен холестерол. Данный состав характеризуется высокой степенью включения серпистена в липосомы (88,75%) и стабильностью при хранении. В качестве альтернативного способа определения размеров частиц с помощью метода лазерной дифракции автором предлагается использовать более доступный метод фотоэлектроколориметрии. Д. Е. Липиным показано, что фотометрический показатель дисперсности суспензии малых однослойных липосом коррелирует с диаметром липосом в интервале от 70 до 200 нм. Образование фитосом с серпистеном доказано при помощи ЯМР³¹ Р спектроскопии. Для выбора состава геля проведены экспериментальные исследования по изучению влияния концентрации карбопола 940, широко используемого в липосомальных гелевых композициях, на реологические параметры липосомальных гелей с серпистеном. В результате проведенной работы предложен состав фармацевтической композиции с серпистеном в виде липосомального геля, разработана его технология, проведена оценка стабильности этой лекарственной формы.

В главе 5 Д. Е. Липиным описаны биологические исследования по оценке безопасности и специфической активности мягких лекарственных форм с серпистеном. Установлено, что мазь и липосомальный гель серпистена не обладают местно-раздражающим действием, при этом наименьший дискомфорт при инстилляции в конъюнктивальный мешок кролика отмечается для липосомального геля серпистена. При изучении регенерирующего действия на модели линейной асептической раны выявлено, что мягкие лекарственные формы с серпистеном обладают репаративным действием. Применение мягких лекарственных форм с серпистеном ускоряет отторжение струпа на 5 дней по отношению к контролю. Мягкие лекарственные формы с серпистеном не уступают по эффективности мягким лекарственным формам зарубежного производства - мази «Бепантен» и крему «Актовегин» - при значительно более низкой концентрации биологически активного вещества. Подтверждена целесообразность включения серпистена в липосомы в отношении уменьшения

раздражающего действия и повышения прочности рубца (на модели линейной раны).

В приложениях приведены материалы, подтверждающие внедрение полученных Д.Е.Липиным результатов.

Степень научной новизны полученных результатов

В ходе выполнения диссертационного исследования:

- Впервые в технологии мягких лекарственных форм использована фармакологически активная субстанция серпистен, представляющая собой сумму фитозкдистероидов, получаемую из листьев серпухи венценосной;
- Разработаны состав и технология получения мази серпистена, обладающей удовлетворительными реологическими параметрами, наилучшим профилем высвобождения и эффективностью в испытаниях *in vivo*. Установлены основные условия проведения спектрофотометрии в УФ-области для определения серпистена в составе мягкой лекарственной формы;
- Получен липосомальный гель серпистена. Установлены показатели контроля технологического процесса и качества липосомальной суспензии: однородность и средний диаметр липосом, дзета-потенциал, фотометрический показатель дисперсности, эффективность включения серпистена в липосомы;
- Получены гомогенные стабильные липосомальные дисперсии с высоким включением серпистена (88,75 %), со средним диаметром частиц 70-90 нм, дзета-потенциал которых составляет минус 37 мВ;
- При помощи ЯМР³¹P спектроскопии доказано образование фитосом с серпистеном.

Практическая значимость работы обусловлена комплексом технологических исследований по разработке и стандартизации мягких лекарственных форм серпистена.

На основании проведенных и экспериментальных исследований:

- Разработаны рациональные технологические схемы получения мази дифильной природы и липосомального геля серпистена;
- Разработана и валидирована методика количественного определения серпистена в мази. Разработан проект ФСП на мазь серпистена 0,02 %;
- Предложен способ контроля технологического процесса получения липосомальных суспензий серпистена с использованием фотометрического показателя дисперсности;

- Предложенная технология и стандартизация мази серпистена апробирована на предприятии ОАО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань).

- Результаты исследования внедрены в учебный процесс ГБОУ ВПО ПФА Минздрава России при подготовке студентов по специальности «Фармация».

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены: на международной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации» (г. Пермь, 2011); на VII Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (г. Сыктывкар, 2011); на XVI Международном съезде «Фитофарм – 2012» (г. Санкт-Петербург, 2012); на международной научно-методической конференции «Сандеровские чтения (г. Санкт-Петербург, 2012 г), на III Международной научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2013); на финальном туре VIII Студенческого краевого конкурса научных проектов по программе «УМНИК» (г. Пермь, 2013); на межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Современная фармация: образование, наука, бизнес» (г. Тюмень, 2014); на научно-практической конференции памяти проф. А. В. Казьянина (г. Пермь, 2014).

По результатам работы опубликованы 10 публикаций, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций.

Степень обоснованности и достоверности научных результатов, положений и выводов диссертации

Анализ диссертационной работы Липина Д. Е. показывает, что все разделы выполнены на современном научном уровне, подтверждены экспериментальными данными. Положения и выводы научно обоснованы и достоверны. Используются современные технологические и физико-химические (газовая и высокоэффективная хроматография, спектрофотометрия, ЯМР ³¹P спектроскопия) методы анализа. Эффективность и безопасность разработанных лекарственных форм с серпистеном подтверждена биологическими исследованиями. Все результаты обработаны при помощи математической статистики, достоверны, убедительны и достаточно хорошо апробированы.

Работа построена логично, выводы по главам и общие выводы полностью соответствуют проведенным исследованиям.

Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации Д.Е.Липина.

При рассмотрении работы возникли следующие **вопрос и замечания:**

Вопрос по работе:

1. Каков вклад основы липосомального геля с серпистеном в проявление дегидратирующего действия лекарственного препарата?

Замечания по работе:

1. В таблице 12 «Показатели качества мазей серпистена до и после термообработки» в показателе «внешний вид» указана только однородность и неоднородность мазей. Следовало либо обозначить данный раздел «однородность», либо привести также сведения в отношении окраски мазей.

2. При закладке мази серпистена на хранение (с.73) не указан вид упаковки мази.

3. При изучении репаративной активности мази и липосомального геля серпистена в качестве препаратов сравнения диссертантом использованы мази. Было бы целесообразно сопоставить активность липосомального геля серпистена с гелевой формой, например, «Актовегин гель».

4. Хотелось бы видеть в общих выводах по работе преимущества липосомальной формы серпистена.

Высказанные замечания и вопросы не принципиальны и не снижают ценности диссертационной работы.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Липина Даниила Евгеньевича «Разработка технологии и стандартизация мягких лекарственных форм, содержащих фитостероиды *Serratula coronata* L.» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Автором проведен большой объем приоритетных исследований, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной задачи по разработке технологии и стандартизации мази и липосомального геля с серпистеном, полученного из перспективного растительного источника – листьев серпухи венценосной, имеющей существенное значение для технологии получения лекарств.

Диссертационная работа Липина Даниила Евгеньевича «Разработка технологии и стандартизация мягких лекарственных форм, содержащих фитостероиды *Serratulacoronata*L.» по своей актуальности, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов,

уровню апробации и опубликованию основных положений в печати соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Д.Е.Липин заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 - технология получения лекарств.

Официальный оппонент:

Доктор фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела), заведующая кафедрой фармации факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
профессор

Егорова Светлана Николаевна

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 420012, Российская Федерация, г. Казань, ул. Бутлерова, 49
Телефон/факс (843) 236-06-52
e-mail: pharm_fpk@kgmu.kcn.ru