

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему «Теоретические и практические аспекты создания фитосубстанций из некоторых видов рода адонис (*Adonis* L.)»

на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности

6D074800 – «Технология фармацевтического производства»

Орынбековой Сауле Оразмуханқызы

Актуальность темы исследования

В настоящее время одним из приоритетных направлений государственной политики Республики Казахстан в сфере здравоохранения и медицины является укрепление общественного здоровья. Согласно Комплексному плану развития фармацевтической и медицинской промышленности на 2020 - 2025 годы (О внесении изменений и дополнений в Распоряжение Премьер-Министра Республики Казахстан от 6 октября 2020 года № 132-р, пункт 30, раздела IV) одной из важнейших задач является организация производства препаратов с использованием лекарственных растений, произрастающих на территории Республики Казахстан.

Для достижения целей и реализации задач развития фармацевтической промышленности и покрытия потребности казахстанцев в лекарственных средствах необходимо проведение комплексных научно-практических исследований по созданию качественных, безопасных лекарственных средств, в том числе растительного происхождения.

В целях обеспечения планомерного снижения зависимости отечественного фармацевтического рынка от импорта лекарственных препаратов предусмотрено более полное использование собственных сырьевых ресурсов, создание новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов из растительного сырья в соответствии с надлежащими практиками GxP. Культивирование лекарственных растений направлено на устойчивое использование природных ресурсов, снижение зависимости от дикорастущего сырья и повышение воспроизводимости фитопрепаратов. Кроме того, культивируемое сырье может быть адаптировано для получения наибольшего содержания целевых биологически активных веществ (БАВ), что увеличивает эффективность производственного процесса.

Расширение номенклатуры видов растительного сырья, и разработка полного цикла субстанций для создания препаратов является перспективным направлением фармацевтических исследований. В этом отношении особый интерес представляют произрастающие во флоре Казахстана адонис тьяншанский (*Adonis tianschanica* (Adolf.) Lipsch.) и адонис летний (*Adonis aestivalis* L.). Несмотря на то, что вышеуказанные виды представляют собой ценные источники биологически активных веществ и находят широкое применение в народной медицине в качестве противовоспалительных, кардиотонических, седативных, диуретических и противосудорожных средств, на сегодняшний день они остаются недостаточно изученными.

Чтобы создать устойчивую сырьевую базу для производства из этих растений лекарственных препаратов и обеспечить стабильное качество их растительного сырья необходимо внедрение этих лекарственных растений в культуру с соблюдением требований «Надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения» GACP. Культивирование лекарственного растительного сырья позволит не только контролировать условия выращивания растений для получения качественного сырья, но и минимизировать влияние на их химический состав природных факторов, таких как климатические и сезонные изменения, а также дает возможность адаптировать растения для получения наибольшего содержания целевых БАВ.

Разработка фармацевтической субстанции из растительного сырья представляет собой многоэтапный процесс, требующий научно обоснованной концепции и корректно выстроенной методологии, основанной на применении стандартных процедур с учетом рискоориентированного подхода для обеспечения качества, безопасности и воспроизводимости целевого продукта в соответствии с требованиями GxP.

Цель диссертационного исследования: экспериментально-теоретическое обоснование технологии и методологии получения растительных фармацевтических субстанций из *A. tianschanica* и *A. aestivalis*, установление профиля фармакологической активности и безопасности.

Задачи исследования:

- Провести сравнительный фармакогностический анализ растительного сырья *A. tianschanica* и *A. aestivalis*;
- Стандартизировать и исследовать стабильность растительных фармацевтических субстанций *A. tianschanica* и *A. aestivalis*;
- Определить безопасность и профиль фармакологической активности полученных растительных фармацевтических субстанций;
- Разработать методологию полного цикла создания растительной фармацевтической субстанции на основе представителей рода *Adonis* L.;
- Разработать технологию культивирования растения *A. tianschanica* и обосновать технико-экономическую целесообразность производства растительной фармацевтической субстанции.

Методы исследования: информационно-аналитические, стандартные фармакопейные и нефармакопейные методы (физические, физико-химические, фармацевтико-технологические, фармакологические, биологические, статистические) и агротехнические.

Объекты исследования: адонис тяньшанский трава (*Adonis tianschanica* (Adolf.) Lipsch.) и адонис летний трава (*Adonis aestivalis* L.).

Предмет исследования: разработка растительных фармацевтических субстанций: комплексное изучение морфолого-анатомических диагностических признаков и химического состава растительного сырья, стандартизация, исследование стабильности, безопасности и профиля фармакологической активности, разработка методологии полного цикла получения растительной фармацевтической субстанции и технико-

экономическое обоснование производства растительной фармацевтической субстанции.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты комплексного фармакогностического исследования лекарственного растительного сырья *A. tianschanica* и *A. aestivalis*: фитохимического, морфолого-анатомического, испытаний для разработки подходов к стандартизации;
- Результаты экспериментально-теоретического обоснования разработки технологии получения растительных фармацевтических субстанций на основе сырья *A. tianschanica* и *A. aestivalis* с противовоспалительной и антиоксидантной активностью;
- Результаты культивирования *A. tianschanica* и технико-экономическое обоснование производства растительной фармацевтической субстанции.

Описание основных результатов исследования:

Обобщение данных литературного обзора позволило систематизировать морфологические, анатомические, химические и фармакологические характеристики рода *Adonis* L., на основании чего обоснован выбор исследуемых видов как перспективных объектов для получения растительных фармацевтических субстанций.

Установлены четкие различия в морфолого-анатомическом строении, включая форму и опушение стебля, рассечённость листьев, окраску цветков, толщину эпидермиса и палисадной мезофиллы, что обеспечило надёжную идентификацию исследуемого сырья.

Экспериментальные данные показали, что концентрация сердечных гликозидов в траве *A. tianschanica* (0,0002 %) и *A. aestivalis* (0,00017 %) значительно ниже, чем у фармакопейного вида *A. vernalis*, что исключает их как источник кардиотонических гликозидов. Вместе с тем, в извлечениях обоих видов обнаружено значительное количество биологически активных веществ: содержание фенольных соединений в *A. tianschanica* составило - 6,272 %, в том числе флавоноидов - 3,992 %, в то время как у *A. aestivalis* - 4,033 % и 2,625 % соответственно. Наиболее эффективным экстрагентом для полярных метаболитов установлен 50 % этанол.

По результатам хроматографического анализа методом HPLC/ESI-QTOF-MS/MS в образцах *A. tianschanica* идентифицировано 27 соединений, в том числе флавоноиды (изокверцитрин, кемпферол, кверцетин и др.), адонитол, следовые количества сердечных гликозидов и алкалоида. В извлечении *A. aestivalis* обнаружено 21 соединение аналогичной природы. Особого внимания заслуживает присутствие в высоких концентрациях пятиатомного спирта - адонитола, выявленного в образцах обоих видов. Это соединение рассматривается как хемотаксономический маркер рода *Adonis* L., а также известно своими выраженными диуретическими и дегидратирующими свойствами, что подтверждается данными научной литературы.

Изокверцитрин, как преобладающий флавоноид *A. tianschanica*, был выделен методом HSCCC и охарактеризован с использованием ЯМР и масс-спектрометрии. Исследование биологической активности выявило

выраженные противовоспалительные и антиоксидантные свойства извлечений: извлечение из *A. tianschanica* и изокверцитрин снижал продукцию противовоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 β , а извлечение из *A. aestivalis* демонстрировало высокую антиоксидантную активность (IC₅₀ ~10–14 мкг/мл). Проведённые *in vitro* и *in vivo* тесты подтвердили низкую токсичность и хорошую биологическую совместимость исследуемых извлечений.

Дополнительным подтверждением фармакологической ценности исследуемых видов стали результаты анализа аминокислотного, липидного и минерального состава. Аминокислотный профиль *A. tianschanica* характеризуется высоким содержанием серина, аспарагина, глутаминовой кислоты, триптофана и валина, при общей концентрации 8,777 мг/г, что свидетельствует о наличии пластических и функциональных компонентов, важных для метаболических процессов. Среди жирных кислот преобладают ненасыщенные: в обеих травах в значительном количестве выявлены линолевая и линоленовая кислоты, причём в полярных липидах *A. aestivalis* уровень линоленовой кислоты группы ω -3 достигал 55,23 %. Такой липидный профиль указывает на потенциальную кардиопротекторную и противовоспалительную активность. Минеральный анализ подтвердил наличие 17 микро- и макроэлементов, включая калий, кальций, магний, железо, марганец, цинк и селен. Установлено, что *A. tianschanica* обладает более сбалансированным минеральным составом: содержание кальция достигает 1200 мг/кг, железа - 40 мг/кг, а марганца - 43 мг/кг. Эти параметры позволяют рассматривать данное растение как перспективное сырьё для создания субстанций, способствующих поддержанию электролитного баланса и нормализации обменных процессов.

На основании комплексных фармакогностических исследований, подтверждающих перспективность изучаемого растительного сырья в качестве источника биологически активных веществ, была проведена стандартизация полученных растительных фармацевтических субстанций.

Стабильность растительных фармацевтических субстанций оценивалась в течение 24 месяцев в условиях долгосрочного хранения (25 $\pm$ 2 °C, 60 $\pm$ 5 % влажности) на трёх сериях в первичной и вторичной упаковке. Все контролируемые параметры на протяжении всего срока соответствовали нормативным требованиям, что подтверждает стабильность растительных фармацевтических субстанций и обосновывает срок годности не менее 24 месяцев.

С целью оценки безопасности и профиля фармакологической активности растительных фармацевтических субстанций были проведены токсикологические и фармакологические исследования.

Результаты *in vivo* испытаний острой и подострой токсичности водно-этанольных извлечений из *A. tianschanica* и *A. aestivalis* показали их низкую токсичность при пероральном введении (LD₅₀ 2853,7 и 5012,8 мг/кг соответственно), что соответствует IV и V классам опасности согласно классификации OECD. Гистоморфологический анализ не выявил патологических изменений в тканях печени, почек и сердца.

In vitro исследования на макрофагальной клеточной линии RAW 264.7 подтвердили отсутствие цитотоксического действия извлечений из *A. tianschanica* (в концентрациях до 50 мкг/мл) и выделенного из него изокверцитрина (до 100 мкм) при сохранении жизнеспособности клеток на уровне выше 85 %. На модели LPS-индуцированных макрофагов установлено достоверное снижение продукции оксида азота (NO) и противовоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α , IL-1 β), что свидетельствует о противовоспалительной активности данных соединений. Кроме того, извлечение из *A. aestivalis* проявило выраженную антиоксидантную активность (IC₅₀ по DPPH - 14,07 мкг/мл; ABTS - 10,75 мкг/мл), обусловленную присутствием полифенольных соединений, включая изокверцитрин.

В рамках практической реализации полученных результатов особое внимание было уделено вопросам культивирования и заготовки растительного сырья. На опытно-промышленных участках ТОО «Fitoleum» проведено агробиологическое исследование *A. tianschanica*, в ходе которого изучены основные онтогенетические стадии и оптимизированы агротехнические условия (стратификация, состав субстрата, удобрения, режим орошения) в соответствии с требованиями GACP. Применение биогумуса обеспечивало максимальную приживаемость рассады (86 %).

Разработанная технология культивирования, а также сбор, сушка и хранение сырья были регламентированы на уровне стандартной операционной процедуры и технологического регламента. Оптимальной температурой сушки установлены параметры 50–60 °С, при которых потери флавоноидов не превышают 4 %, тогда как при воздушно-теновой сушке - до 18 %. Максимальное содержание флавоноидов зафиксировано в фазу цветения и начала плодоношения. Полученные данные подтверждают эффективность внедрения технологии для формирования стабильной сырьевой базы.

Проведённое технико-экономическое обоснование производства растительной фармацевтической субстанции на основе *A. tianschanica* подтвердило её высокую производственную эффективность и коммерческую целесообразность. Использование местного сырья и адаптированных технологий обеспечивает высокую конкурентоспособность продукции на внутреннем и внешнем рынках. Полученные результаты послужили основанием для вывода на фармацевтический рынок отечественной растительной субстанции, предназначенной для производства лекарственных средств, с подтверждённым потенциалом к промышленному внедрению.

Обоснование научной новизны.

Впервые:

- были выявлены морфологические и анатомические диагностические признаки в рамках фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья *A. tianschanica* и *A. aestivalis*.

- проведён детальный фитохимический анализ извлечений из *A. tianschanica* и *A. aestivalis* с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с электроспрейной ионизацией и квадрупольным

тандемным масс-спектрометром (HPLC/ESI-QTOF-MS/MS), характеризующимся высокой чувствительностью и точностью измерения молекулярных масс.

- была установлена безопасность растительных фармацевтических субстанций *A. tianschanica* и *A. aestivalis*, а также отсутствие их цитотоксического действия.

- установлены противовоспалительная активность субстанции *A. tianschanica* и антиоксидантная активность субстанции *A. aestivalis*. В условиях *in vitro* извлечение из *A. tianschanica* и выделенный из него изокверцитрин снижали продукцию NO и противовоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α , IL-1 β) в LPS-индуцированных макрофагах. Извлечение из *A. aestivalis* продемонстрировало выраженную антиоксидантную активность, сопоставимую с действием стандартных антиоксидантов, что обусловлено присутствием полифенольных соединений, включая изокверцитрин.

- разработана методология полного цикла создания фармацевтической субстанции из растений рода *Adonis* L. Получено свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №53681 от 21 января 2025 года.

- разработана технология культивирования растения *A. tianschanica* в соответствии с требованиями GACP. Получен патент №7727 «Способ фитоинтродукции растений рода *Adonis* L.».

Практическое значение полученных результатов:

Внедрена технология культивирования, сбора, заготовки и хранения лекарственного растительного сырья *A. tianschanica* на предприятии ТОО «FitOleum», Акт внедрения на ТОО «FitOleum» №1 от 28.05.2025.

Разработана стандартная операционная процедура (СОП) «Культивирование, сбор, сушка и хранение адониса тяньшанского» в рамках современной концепции качества (GxP и ICH (Q9, Q10, Q11)).

Проведено расширение номенклатуры фармакопейных видов адониса путем включения в проект «Перечень фармакопейных видов лекарственных растений Республики Казахстан» видов *A. tianschanica* и *A. aestivalis*.

Разработаны проекты нормативно-технической документации, включая:

- технологический регламент на получение растительной фармацевтической субстанции «Адониса тяньшанского трава»;
- спецификации качества на растительные фармацевтические субстанции «Адониса тяньшанского трава» и «Адониса летнего трава».

На кафедре фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники НАО «КазНМУ им.С.Д. Асфендиярова» внедрены в учебный процесс «Сравнительный анализ фармакопейных требований к растениям, содержащим сердечные гликозиды и флаванойды», акт внедрения №2 от 01.02.2023 г. и «Методология создания растительной фармацевтической субстанции из растений рода *Adonis* L.)», акт внедрения № 3 от 27.10.2023 г.

На базе кафедры микробиологии Люблинского медицинского университета, внедрены в учебный процесс результаты фитохимического анализа и установления профиля фармакологической активности.

Разработано технико-экономическое обоснование производства растительной фармацевтической субстанции путем культивирования на предприятии ТОО «Fitoleum», г.Есик, Республика Казахстан.

Личный вклад докоранта.

Соискателем проведен самостоятельный анализ и систематизация данных отечественной и зарубежной научной литературы, а также проведен полный цикл экспериментальных исследований в рамках диссертационной работы. Достоверность результатов и основных положений, выносимых на защиту, подтверждается значительным объемом экспериментальных данных, полученных в ходе исследований, выполненных в лабораторных и производственных условиях с использованием современного оборудования и инновационных методик.

Выводы

1. Результаты литературного обзора позволили систематизировать морфологические, химические, фармакологические и агробиологические особенности растений рода *Adonis* L. Установлено, что *A. aestivalis* ранее был описан ограниченно, *A. tianschanica* практически не изучен в современной научной литературе. Это обосновывает необходимость углублённого исследования данных видов.

2. Разработка растительной фармацевтической субстанции представляет собой научно обоснованный многоэтапный процесс, соответствующий фармакопейным и нормативным требованиям в части качества, безопасности и эффективности продукции. В данной работе разработана поэтапная методика стандартизации субстанции на основе растений рода *Adonis* L. с учётом возможной адаптации к условиям отечественного фармацевтического производства. Указанная методика зарегистрирована как объект интеллектуальной собственности под авторским свидетельством № 53681 от 21 января 2025 года.

3. Между *A. tianschanica* и *A. aestivalis* выявлены отчетливые отличия в макро- и микроскопическом строении. Концентрации сердечных гликозидов в обоих видах (*A. tianschanica* - $0,0002 \pm 0,001$ %, *A. aestivalis* - $0,00017 \pm 0,002$ %) оказались существенно ниже, чем у фармакопейного вида *A. vernalis*, что не позволяет рассматривать их как перспективный источник кардиотонических гликозидов. Сравнительная экстракция с использованием воды, 50 % и 96 % этанола показала, что 50 % этанол является наиболее эффективным растворителем для получения флавоноидов. Химический состав извлечений был определён методом HPLC/ESI-QTOF-MS/MS: в образцах *A. tianschanica* идентифицировано 27 соединений, в *A. aestivalis* - 21. Ведущими компонентами в обоих случаях выступали флавоноиды - кемпферол, кверцетин и изокверцитрин. Также в следовых количествах обнаружены строфантин и цимарин (сердечные гликозиды), а также алкалоид эмбелин. Существенное содержание пятиатомного спирта адонитола, хемотаксономического маркера рода *Adonis* L., подтверждено в обеих пробах.

4. При стандартизации растительных фармацевтических субстанций из *A. tianschanica* и *A. aestivalis* количественное определение биологически

активных веществ (БАВ) проводилось с учётом суммарного содержания флавоноидов и адонитола. Определение флавоноидов выполнено методом спектрофотометрии в УФ и видимой области с пересчётом на изокверцитрин. Спектры показали полное соответствие между спектром комплекса флавоноидов и стандартного изокверцитрина ($\sim\lambda = 410$ нм), что подтверждает точность и селективность метода. Исследование стабильности субстанций проводилось в течение 24 месяцев при стандартных условиях долгосрочного исследования стабильности, в первичной и вторичной упаковках, в трёх независимых сериях.

5. Извлечения из *A. tianschanica* и *A. aestivalis*, полученные на водно-этанольной основе, продемонстрировали низкую токсичность при пероральном введении: LD₅₀ для *A. tianschanica* составил 2853,7 мг/кг, для *A. aestivalis* - 5012,8 мг/кг, что соответствует IV и V классам токсичности по классификации OECD. Гистоморфологические исследования не выявили патологических изменений в тканях печени, почек и сердца. В *in vitro* моделях с макрофагальной линией RAW 264.7 не было обнаружено цитотоксического эффекта ни у извлечения из *A. tianschanica* до концентрации 50 мкг/мл, ни у изолированного изокверцитрина до 100 мкм. Во всех вариантах жизнеспособность клеток превышала 85 %, что свидетельствует о хорошей биологической совместимости. Установлено достоверное снижение продукции оксида азота (NO), IL-6, TNF- α и IL-1 β при применении указанных соединений: извлечение из *A. tianschanica* снижал уровень NO на 24,5 %, IL-6 - на 60 %, изокверцитрин - NO на 34,3 %, IL-1 β - на 52,7 %. Извлечение из *A. aestivalis* показал выраженную антиоксидантную активность: IC₅₀ по DPPH - $14,07 \pm 0,10$ мкг/мл, ABTS - $10,75 \pm 0,11$ мкг/мл, CUPRAC - $A_{0.5} = 45,00 \pm 0,88$ мкг/мл, что обусловлено присутствием полифенолов, включая изокверцитрин.

6. Экспериментальные данные, полученные на опытно-промышленных участках фармацевтического предприятия ТОО «Fitoleum», позволили всесторонне обосновать биологические и агротехнические условия культивирования *A. tianschanica* в культуре. Применение биогумуса обеспечило наилучшую приживаемость и темпы роста рассады (86 %). Это подтвердило эффективность внедрения технологии возделывания данного вида для формирования стабильной сырьевой базы. На основании исследований разработаны и утверждены предприятием стандартная операционная процедура «Культивирование, сбор, сушка и хранение *A. tianschanica*» и технологический регламент на получение растительной фармацевтической субстанции из травы тяньшанского адониса. Проведённое технико-экономическое обоснование производства обосновывает рациональность применения отечественного растительного сырья и адаптированных технологических решений. Учитывая высокую себестоимость импортируемых фитосубстанций, внедрение локальных ресурсов способствует повышению доступности конечной продукции и обеспечивает её устойчивую конкурентоспособность как на внутреннем, так и на внешнем фармацевтическом рынке.

Апробация результатов диссертации

Основные положения диссертационной работы доложены и опубликованы в материалах: VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2018 г.); VII научно-практической конференции с международным участием «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (г. Алматы, 2018 г.); VI Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (г. Шымкент, 2018 г.); IV Международной-научной практической конференции «Global science and innovations 2019: Central Asia» (г. Астана, 2019 г.); XIV международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной «Годам села, туризма и народных ремесел (2019-2021)» «Научная дискуссия: Актуальные вопросы, достижения и инновации в медицине» (г. Душанбе, Таджикистан, 2019 г.); IV международной научной конференции «Scientific Discoveries» (Карловы Вары, Чехия – Москва, Россия, 2019 г.); Международной научно-практической конференции студентов, молодых ученых и преподавателей «Акановские чтения: Роль ПМСП в достижении всеобщего охвата услугами здравоохранения» (г. Алматы, 2019 г.).

Публикации

По результатам исследований опубликовано 13 научных работ, в том числе:

- статья в международном рецензируемом научном журнале, входящем в базы данных Scopus и Web of Science Core Collection (квартиль Q2) – 1;
- статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК – 4;
- тезисы на международных научно-практических конференциях (Чехия, Россия, Таджикистан, Казахстан) – 6;
- патенты Республики Казахстан на полезную модель – 1;
- свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом – 1.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 131 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, включает 27 таблиц, 29 рисунков, список использованной литературы, насчитывающий 135 источников, а также приложения. Структура диссертации включает: введение, обзор литературных данных, раздел, посвященный материалам и методам исследования, три раздела, содержащих результаты собственных исследований, выводы и заключение.