

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук, начальника лаборатории микробиологии испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Гунар Ольги Викторовны

на диссертацию Цибизовой Александры Александровны «Иммуотропная и противомикробная активность хинозолиновых производных», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в диссертационном совете Д208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность

Термин иммунитет вошел в медицинскую практику во второй половине XIX века, когда начинали активную разработку способов вакцинации для защиты людей от инфекционных заболеваний. В настоящее время понятно, что иммунные механизмы защиты срабатывают всегда, когда конкретный организм сталкивается с тем или иным чужеродным материалом – будь то бактерии, вирусы, мутационно измененные собственные клетки тела, тканевые или органые трансплантаты или просто химические соединения, которым приданы иммуногенные свойства. Иначе говоря, иммунитет – есть способ защиты организма от всех антигенно чужеродных веществ, как экзогенной так и эндогенной природы. Биологический смысл подобной защиты – обеспечение биологической целостности организма в течение жизни.

Для минимизации нарушений иммунологической реактивности организма необходимы новые безопасные и эффективные иммуотропные лекарственные препараты. Для этого исследуют различные группы химических соединений. При этом повышенное внимание обоснованно привлекают пиримидины – природные нуклеотиды, оказывающие полифункциональное влияние на процессы секреции иммуомедиаторов, пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза и регенерации.

Среди пиримидиновых соединений хинозолиновые производные уже имеют обоснованную многочисленными исследованиями фармакологическую активность. Однако остаются не доказанными противомикробные и иммуномодулирующие свойства химических веществ из группы хинозолиновых производных.

Научная новизна и практическая значимость результатов работы

Впервые выполнено сравнительное изучение зависимости выраженности иммуотропных и противомикробных свойств новых химических соединений из группы хинозолиновых производных от их химического строения. Выявлены два наиболее перспективных вещества из девяти изученных. Определены наиболее эффективные дозы и оптимальный период их введения в зависимости от фазы индукции иммунопатологии.

Впервые установлено, что изучаемые хинозолиновые производные восстанавливают параметры иммуногенеза, показатели белой крови и фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови на фоне экспериментально смоделированной иммунодепрессии и стресса.

Впервые доказано, что изучаемые хинозолиновые производные обладают антимикробной активностью и повышают выживаемость животных в условиях генерализованной инфекции, снижая бактериальную контаминацию внутренних органов и крови.

В процессе работы выявлены наиболее перспективные хинозолиновые производные, которые в дальнейшем могут служить основой для создания иммуотропных и противомикробных лекарственных препаратов.

Результаты изучения иммуотропной и антимикробной активности хинозолиновых производных внедрены в образовательный и научный процесс следующих организаций: Астраханского государственного медицинского университета, Волгоградского государственного медицинского университета, Курского государственного медицинского университета, Петрозаводского государственного медицинского университета и Пермской государственной фармацевтической академии.

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертационной работы

Для диссертационной работы автором выбраны современные методики сбора и обработки данных. Результаты исследования получены на достаточном количестве экспериментальных животных и соответствуют требованиям руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Все основные положения диссертационной работы аргументированы и открывают перспективы для дальнейшего изучения хиназолиновых производных и возможного их использования в качестве лекарственных препаратов.

Материалы таблиц, рисунков и схем корректны и не вызывают вопросов.

Достоверность полученных результатов обеспечена большим объемом проведенных исследований, а также выбором адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Структура работы

Диссертационная работа изложена на 162 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора имеющихся литературных данных, раздела с описанием используемых материалов и методов, 4 глав собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 274 источника, в том числе 193 отечественных и 81 зарубежных публикаций. Работа иллюстрирована 30 рисунками, 17 таблицами и 8 схемами.

Диссертационная работа построена по традиционному типу.

Во введении автор обосновывает актуальность диссертационного исследования и степень изученности проблемы, формирует цель и задачи, поставленные для ее достижения, научную новизну и практическую значимость, т.е. все положения, необходимые для вводной части диссертационной работы.

В структурированном **обзоре литературы** представлены:

- современные представления о физиологических и патологических механизмах иммунитета,

- данные о современных лекарственных средствах для коррекции иммунитета и их классификация,

- анализ основных механизмов действия производных пиримидинов с учетом их фармакологической активности.

Обзор литературы изложен с соблюдением логики рассуждений и соответствует заданной теме исследований.

Глава «Материалы и методы» содержит описание реактивов и оборудования, а также групп животных, при проведении экспериментов на которых были учтены требования Комиссии по проблемы этики отношения к животным Российского национального Комитета по биоэтики при Российской академии наук, международные этические нормы, а также одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России.

В работе использовали методики, рекомендованные для оценки новых фармакологических субстанций, среди которых:

- стандартные иммунофармакологические тесты для подтверждения иммунореактивности животных,

- метод последовательных разведений *in vitro* с применением тест-культур для изучения противомикробной активности,

- моделирование генерализованной инфекции *in vivo* на мышах 5-недельного возраста для доказательства формирования противоифекционного иммунитета и выживаемости животных.

В **третьей главе** представлены результаты собственных экспериментов.

В первую очередь изучена потенциальная иммуотропная активность девяти хиназолиновых производных при сравнении с метилурацилом в средней терапевтической дозе 25 мг/кг. Степень выраженности иммунокорригирующего эффекта была показана по изменению органомерических показателей тимуса и селезенки экспериментальных

животных. На основании выявленных изменений массы и клеточности иммуотропных органов животных на фоне индуцированной иммунодепрессии были определены два наиболее активных соединения VMA-13-03 и VMA-13-04.

Полученные диссертантом результаты сравнительного анализа органомерических показателей и общих иммунофармакологических тестов показали, что наиболее выраженное действие изучаемые хиназолиновые производные оказывали в дозе 1/10 Mr.

Четвертая глава посвящена изучению иммуотропных свойств хиназолиновых производных в условиях моделирования состояния гиперактивности иммунной системы после внутрибрюшинного введения липополисахарида в дозе 100 мкг/кг. Оценку проводили в виде стандартных иммунофармакологических тестов по изменениям массы и количества ядросодержащих клеток иммунных органов.

Автором доказано, что исследуемые химические соединения в условиях острого иммунного стресса приводят к коррекции пролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах.

В **пятой главе** представлены результаты глубокого изучения воздействия хиназолиновых производных на показатели белой крови в условиях экспериментальной иммунной депрессии и острого липополисахаридного иммунного стресса. На основании полученных автором статистически достоверных значений количества лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов доказано их иммунокорректирующее влияние на макрофагально-фагоцитарное звено иммунитета.

Шестая глава посвящена исследованиям в области антимикробной активности изучаемых соединений. В работе показано, что субстанция VMA-13-3 оказывала бактерицидную активность в отношении *S.aureus* в концентрации 128 мкг/мл, бактериостатическое действие в концентрации 16 мкг/мл, в отношении *K.pneumonia* и *C.freundii* влияние было обнаружено в концентрациях 16 и 64 мкг/мл соответственно. Субстанция VMA-13-4

проявляла бактериостатическое действие в отношении *S. aureus* в значительно более низкой концентрации, а именно 4 мкг/мл.

Особого внимания заслуживает этап диссертации, где автор демонстрирует снижение летальности экспериментальных животных на фоне формирования противомикробного иммунитета и выраженного терапевтического действия антибактериальной направленности в условиях генерализованной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением *S. aureus*, сравнимое с антибиотиком цефтриаксоном. Диссертант делает предположение и обсуждает возможный механизм противомикробного эффекта изучаемых соединений.

Седьмая глава – обсуждение результатов, где автором проведен сравнительный анализ и сопоставление экспериментальных данных между собой и имеющимися литературными данными.

Выводы диссертационного исследования соответствуют поставленным задачам, логичны, обоснованы и отражают сущность выполненного исследования.

Цель, поставленная в диссертации, достигнута, поэтому данное исследование можно считать завершенным и заслуживающим положительной оценки.

Вместе с тем, при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы и замечания:

1. В диссертационной работе (с.98) указаны признаки характерного роста для штаммов *Staphylococcus aureus*, *Klebsilla pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*. На каких диагностических твердых питательных средах были получены описанные колонии?
2. Почему именно пипемединовая кислота была выбрана в качестве образца сравнения?
3. Для анализа противомикробной активности автором использовался пробирочный метод, для учета результатов которого использовал аббревиатуру «+» или «++++», что носит несколько субъективный характер.

Почему не был применен чашечный метод и расчет % выявленных колоний по сравнению с теоретическим количеством вносимых микроорганизмов при различных концентрациях изучаемых веществ?

4. Что такое индекс обсемененности и как его рассчитать?

5. Целесообразно было бы сократить объем 2 положения, выносимого на защиту.

6. Интересно было бы выполнить микробиологические исследования, имея культуры сравнения в виде музейных тест-штаммов микроорганизмов, полученных из официальных коллекций.

7. Чем можно доказать предположение высказанное автором, что выбор наиболее активной дозы хиназолиновых производных пиримидина, обеспечивающий выраженный иммуностропный эффект определяется особенностью химической структуры и какой именно особенностью?

8. Связано ли иммунотерапевтическое и иммунопрофилактическое действие разрабатываемых образцов с их концентрациями? Можно ли разделить иммунотерапевтическое и иммунопрофилактическое направления использования этих веществ?

Представленные замечания не носят критический, принципиальный характер и не снижают положительной оценки рассматриваемой диссертации.

Диссертационная работа Цибизовой А.А. оформлена в полном соответствии с ГОСТ 7.0.11.-2011.

Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы, по материалам которой опубликовано 16 печатных работ, в том числе 6 из них – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Диссертационная работа Цибизовой Александры Александровны соответствует заявленной специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Заключение

Диссертационная работа Цибизовой Александры Александровны «Иммунотропная и противомикробная активность хинозолиновых производных» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, связанной с обоснованием перспектив поиска лекарственных средств с иммунотропной и противомикробной активностью в ряду бензаннелированных химических соединений из группы хиназолиновых производных.

Работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым действующим «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным ПП РФ от 24.09.2013 г. № 842, к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Цибизова Александра Александровна, заслуживает присуждение ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Доктор фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия, начальник лаборатории микробиологии испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации



Гунар Ольга Викторовна

Подпись Гунар Ольги Викторовны заверяю

Ученый секретарь Ученого совета
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, к.м.н.



Климов Владимир Иванович

« 21 » 01 2020 г.

127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Тел. +7 (495) 625-43-48

Адрес электронной почты: gunar@expmed.ru

СВЕДЕНИЯ

Об официальном оппоненте по диссертации Цибизовой Александры Александровны на тему «Иммунотропная и противомикробная активность хиназолиновых производных» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06. Фармакология, клиническая фармакология, представленной в диссертационный совет Д. 208.008.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фамилия, имя, отчество	Место основной работы (название организации, должность)	Ученая степень (шифр специальности, по которой защищена докторская диссертация) и ученое звание	Основные работы по профилю оппонируемой диссертации (за последние 5 лет, опубликованные в рецензируемых журналах)
Гунар Ольга Викторовна	начальник лаборатории микробиологии испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ.	доктор фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия)	1. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Количественное определение микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств с использованием системы "Milliflex® quantum" // Фармация. 2019. Т. 68. № 3. С. 5-11. 2. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Методы идентификации микроорганизмов при анализе качества лекарственных средств и оценка их применимости // Химико-фармацевтический журнал. 2018. Т. 52. № 11. С. 55-58. 3. Сахно Н.Г., Гунар О.В., Рощина М.В., Колосова Л.В., Григорьева В.Э. Выделение анаэробных бактерий при анализе качества лекарственных средств // Химико-фармацевтический журнал. 2018. Т. 52. № 6. С. 61-64. 4. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Рябцева М.С., Агаширинова А.А., Гунар О.В. Альтернативные биологические методы оценки качества лекарственных средств // Фармация. 2017. Т. 66. № 2. С. 7-10. 5. Крылов В.И., Моисеев С.В., Кутин А.А., Сахно Н.Г., Гунар О.В., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Синтез и антибактериальная активность бис-(1-(адамантан-1-ил)этил)амин гидрохлорида // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 12. С. 24-27. 6. Гунар О.В., Сахно Н.Г., Григорьева В.Э., Булгакова Г.М. Антимикробная активность препаратов прополиса при проведении экспертизы качества лекарственных средств // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2015. № 2. С. 17-19.