

ОТЗЫВ

официального оппонента

заведующего кафедрой фармацевтического анализа федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктора фармацевтических наук, доцента,

Белоусова Михаила Валерьевича

по диссертации Сафронюка Сергея Леонидовича соискателя на тему:

«Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биолюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, по специальности

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность выполненного исследования

Разработка новых методов, направленных на контроль качества лекарственных средств, в том числе антибиотиков, является одной из актуальных задач фармацевтической науки. В настоящее время для определения антимикробной активности известно большое количество методик, таких как диффузионные методы (Е-тесты, диффузия из лунок в агаре, из агаровых блоков), методы разведения в агаре, в жидкой питательной среде и др.

В связи с тем, что данные подходы представляют собой многостадийные и трудоемкие процессы, работа Сафронюка С.Л. направлена на разработку, унификацию и стандартизацию новых методик биолюминесцентного анализа оценки антимикробной активности веществ различного химического строения с применением биолюминесцентных бактерий. Подходы основаны на применении в качестве тест-объектов микроорганизмов, интенсивность свечения которых, регистрируется с помощью современных приборов, характеризуются высокой чувствительностью и экспрессностью.

8	№	76
ЛИСТОВ	18	11 20 22
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации тел./факс +7(846) 374-10-03		

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Автором выделены наиболее значимые результаты, обладающие научной новизной и имеющие практическую значимость:

1) По результатам оценки биологических и аналитических характеристик новых природных люминесцентных бактерий впервые установлено, что штамм *P. leiognathi* Sh1 является перспективным тест-объектом для изучения антимикробной активности фармацевтических субстанций, а оценка 8-ми штаммов генно-инженерных люминесцентных тест-объектов на основе *E. coli* показала их применимость для определения механизмов антимикробной активности.

2) В результате изучения чувствительности тест-штамма *P. leiognathi* Sh1 к действию фармацевтических субстанций различных химических групп, было показано влияние структуры и физико-химических свойств исследованных субстанций на интенсивность бактериального свечения.

3) Впервые разработана методика определения антимикробного действия с использованием биолюминесцентного тест-штамма *P. leiognathi* Sh1, основанная на измерении биолюминесцентного индекса (БЛИ), а также проведена ее валидационная оценка.

4) Разработанная методика по изучению антимикробной активности лекарственных веществ с использованием природного биолюминесцентного штамма *P. leiognathi* Sh1 была испытана при скрининге антибактериальной активности 42-х направленно синтезированных производных NKV, а с использованием 8-ми штаммов lux-биосенсоров на основе *E. coli* определены механизмы их антимикробной активности.

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

Экспериментальные исследования диссертационной работы доложены и обсуждены на межвузовских, всероссийских, международных научно-

практических конференциях состава, аспирантов, студентов и молодых ученых и др. Результаты получены с использованием современного сертифицированного оборудования и обработаны с использованием статистических методов.

Сформулированные в диссертации положения обоснованы и логически вытекают из результатов анализа литературных источников. Автором были освещены все задачи, аргументированы выводы с соблюдением четкой последовательности.

По результатам диссертационной работы автором опубликовано 25 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 1 статья в перечне ВАК по состоянию на 03.10.2014. Согласно письма Минобр. науки РФ № 13-3869 от 02.10.2014, 1 статья в международных базах данных. Результаты исследований подтверждаются 2-мя патентами Украины.

Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Результаты диссертационной работы (методы анализа ФС и производных NKV на основе природных и генно-инженерных люминесцентных бактерий) используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре медицинской и фармацевтической химии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского».

Полученные автором сведения внедрены в научно-исследовательскую работу ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени НБС — ННЦ РАН», АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод», на кафедру базисной и клинической фармакологии Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» и Центральную

научно-исследовательскую лабораторию Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского».

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Сафронюка С.Л. состоит из содержания, введения, литературного обзора, главы «Объекты и методы исследований», 3-х глав с результатами и обсуждением экспериментальных исследований, списка литературы источников и приложения с актами внедрения, патентами и пр. Все структурные части работы соблюдены и содержат убедительно доказанные сведения. Автор проанализировал имеющиеся источники по этой проблеме и в начале исследования указал на актуальность и важность проведения диссертационного исследования.

Первая глава работы посвящена анализу отечественной и зарубежной литературы по рассматриваемой проблеме. Сафронюк С.Л. описывает современное представление об методах исследования антимикробной активности веществ, в том числе использование в аналитических целях биоломинесцентных тест-систем.

Во второй главе описаны объекты и методы, использованные в диссертационном исследовании.

Для разработки методических подходов к изучению антимикробной активности лекарственных веществ, в третьей главе были изучены биологические и аналитические характеристики природных и генно-инженерных люминесцентных тест-объектов, оценена их применимость для анализа фармацевтических субстанций различных химических групп. Биотестирование веществ проводили по методикам анализа 15, 30, 60 минутного и 18-ти часового влияния на бактериальную биоломинесценцию штаммов *P. leiognathi* Sh1, *A. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms3 исследуемого агента.

В четвертой главе показаны результаты определения антимикробной активности фармацевтических субстанций, с использованием природных

биолюминесцентных тест-бактерий штамма *P. leiognathi* Sh1, а также влияние физико-химических свойств и химической структуры фармацевтических субстанций на показатель их антимикробной активности. В тоже главе описана методика анализа антимикробной активности фармацевтических субстанций с использованием биолюминесцентных тест-объектов и определены некоторые валидационные характеристики.

В пятой главе показана возможность использования разработанной методики для скрининга направленно синтезированных производных 2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV) на наличие антимикробной активности.

Выводы полностью соответствуют основным результатам работы.

По теме диссертации опубликовано работ, 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, одна из которых входит в перечень ВАК по состоянию на 03.10.2014, 1 статья в международных базах данных, оформлено 2 патента.

Вместе с тем, несмотря на общую положительную оценку, по диссертационной работе Сафронюка С.Л. возник ряд вопросов и замечаний.

1. В своей работе автор приводит разработанную методику определения антимикробной активности фармацевтических субстанций с применением в качестве тест-штамма биолюминесцентные бактерий *P. leiognathi* Sh1, в то же время, хотелось бы услышать ключевые преимущества данной методики перед стандартным методом диффузии в агар?

2. С чем связан выбор гентамицина сульфата в качестве образца сравнения антимикробной активности лекарственных веществ? Почему не провели сравнение полученных данных с остальными антибиотиками, представленными в исследовании?

3. Приемлемо ли использование разработанной методики для оценки антимикробной активности других антибиотиков, например,

производных 6-Аминопенициллановой кислоты, 7-Аминоцефалоспоровой кислоты и хинолонов?

4. Одной из неотъемлемых характеристик при валидации аналитической методики является специфичность. Оценивали ли вы данный параметр, если да, то как?

5. Чем обоснован выбор 2-[(3-R-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)-тио]уксусных кислот (NKV) как тестовой группы веществ для испытания разработанной вами методики оценки антимикробной активности?

6. Каковы практические и теоретические перспективы дальнейшего использования разработанных методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием природных биолюминесцентных бактериальных тест-объектов?

7. Какую из ОФС, по мнению автора, более рационально использовать при валидации предлагаемого метода: ОФС. 1.1.0021.18 "Валидация микробиологических методик", или ОФС.1.1.0012.15 "Валидация аналитических методик".

8. В таблице 9 не представлены доверительные интервалы для минимальной ингибирующей и бактерицидной концентраций для производных 2-[(3-R-8-R1-9-R2-10-R3-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хиназолин-6-ил)тио]уксусных кислот с кодами - 44, 45, 47, 51, 52, 67 при оценке их влияния на штаммы *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*.

Необходимо отметить, что данные вопросы и замечания не принципиальны носят рекомендательный, дискуссионный и уточняющий характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат и диссертационная работа Сафронюка Сергея Леонидовича соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пункту 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления», а также пунктам 1 и 4 паспорта научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки).

Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»

Таким образом, диссертационная работа Сафронюка Сергея Леонидовича на тему: «Разработка методических подходов к анализу антимикробной активности лекарственных веществ с использованием биоллюминесцентных бактериальных тест-объектов», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки), является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи современной фармацевтической науки по изучению антимикробной активности лекарственных веществ.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Сафронюка Сергея Леонидовича соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 20.03.2021 № 426), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее

автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фармацевтического анализа
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Тел: +7 (382) 290-11-01 доб. 1927, e-mail: mvb63@mail.ru
доктор фармацевтических наук,
(15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия,
14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология),
профессор



Белоусов Михаил Валерьевич



С отзывом ознакомлен

18.11.2022

