11 листов № 1230/02-23-118
05 11 2026
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации
тел./факс +7(846)

ОТЗЫВ

официального оппонента заведующего кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, профессора Шмыгаревой Анны Анатольевны по диссертации Османовой Селины Ягьяевны на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

1. Актуальность выполненного исследования

Современный этап развития фармацевтического анализа характеризуется возрастающими требованиями к объективности, экспрессности и воспроизводимости методов оценки качества лекарственных средств. Одним из ключевых показателей, определяющих качество антибактериальных препаратов, является их антимикробная активность, которая служит не только характеристикой биологической эффективности, но и критерием стандартизации готовых лекарственных форм. В соответствии с действующей нормативной документацией (ГФ РФ XIV изд.), данный показатель регламентируется к определению методом диффузии в агар. Однако, несмотря на свою широкую распространенность, указанный подход сопряжен с рядом существенных ограничений: трудоемкостью пробоподготовки, продолжительностью анализа, необходимостью использования биологических объектов, отнесенных к различным группам патогенности, а также критической зависимостью результата от качества питательных сред и условий культивирования. Это создает объективную потребность в поиске альтернативных аналитических решений,

обеспечивающих сопоставимую информативность при меньшей затратности и большей технологичности. В этой связи особый научный и практический интерес представляют методы, базирующиеся на феномене бактериальной биолюминесценции. Данные подходы, изначально применяемые в экологическом мониторинге и биотестировании, в последние годы активно адаптируются для оценки биологической активности фармацевтических субстанций. Их преимущества – высокая чувствительность, скорость получения результата, простота аппаратурного оформления и отсутствие необходимости в работе с патогенными культурами – делают их перспективной альтернативой классическим микробиологическим методикам. Тем не менее, исследований, посвященных валидации биолюминесцентного анализа применительно к определению антимикробной активности антибиотиков в условиях фармакопейного контроля качества, в отечественной и зарубежной литературе представлено недостаточно.

2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений и заключается в существенном расширении методологических подходов к оценке качества антибактериальных лекарственных средств. Автором впервые системно изучена и экспериментально подтверждена принципиальная возможность использования биолюминесцентных бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 в качестве альтернативной тест-системы для количественного определения антимикробной активности антибиотиков, что открывает новое направление в фармацевтическом анализе, выходящее за рамки традиционных подходов, регламентированных действующей Государственной Фармакопеей.

Ключевым элементом новизны является валидационная оценка разработанных биолюминесцентных методик, включающая определение специфичности, линейности, прецизионности и правильности, что

подтверждает их метрологическую пригодность для целей стандартизации лекарственных средств. Автором впервые определена антимикробная активность восьми фармацевтических субстанций (кларитромицин, меропенем тригидрат, хлорамфеникол, налидиксовая кислота, левофлоксацин гемигидрат, ципрофлоксацин, фуразолидон, фурацилин) в биолюминесцентном индексе, что расширяет существующие представления о биологической активности данных соединений.

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

Достоверность научных положений и выводов диссертационного исследования обеспечивается комплексным подходом к решению поставленных задач, использованием современного высокоточного аналитического оборудования (биохемилюминометры, ВЭЖХ-системы), стандартизированных тест-культур и референтных методик, регламентированных Государственной Фармакопеей РФ XIV издания. Критически важным элементом достоверности является параллельное исследование химической деградации антибиотиков методом ВЭЖХ в условиях стандартной процедуры определения активности, что позволило автору объективно интерпретировать полученные биолюминесцентные данные и исключить влияние продуктов разложения на конечный результат. Корректность статистической обработки экспериментальных данных, воспроизводимость результатов в серии параллельных определений, а также сопоставление полученных значений с данными классических микробиологических методов (диффузия в агар) подтверждают надежность и обоснованность сделанных выводов.

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

Существенным вкладом в развитие фармацевтической науки является разработка проекта общей фармакопейной статьи «Определение антимикробной активности антибиотиков и других противомикробных средств методом биолюминесцентного анализа», что имеет прямое отношение к совершенствованию нормативной базы контроля качества лекарственных препаратов. Научная новизна исследования подтверждена двумя патентами РФ на изобретения, что является объективным свидетельством оригинальности и патентоспособности полученных решений.

Совокупность полученных результатов имеет теоретическое значение – расширение представлений о биолюминесцентном отклике микроорганизмов на воздействие антибактериальных средств. Кроме того, полученные автором результаты можно использовать в фармацевтическом анализе, стандартизации лекарственных средств, научных исследованиях и учебном процессе, что полностью соответствует критериям значимости диссертационной работы для развития отечественной фармацевтической химии.

5. Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 152 отечественных и 172 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 54 рисунками.

Глава 1 представляет собой литературный обзор, в котором систематизированы современные подходы к определению антимикробной активности антибактериальных лекарственных средств. Автор детально анализирует традиционные методы (диффузия в агар, серийные разведения, Е-тесты, турбидиметрия), критически оценивая их ограничения –

трудоемкость, продолжительность, зависимость от квалификации персонала и качества питательных сред. Особое внимание уделено анализу научных публикаций, посвященных применению биолюминесцентных бактерий в качестве тест-систем для оценки биологической активности веществ, что позволило автору обосновать перспективность использования данного подхода в фармацевтическом анализе. Логическим завершением главы является обоснование необходимости разработки альтернативного экспресс-метода, лишенного недостатков классической методологии.

Глава 2 содержит детальное описание объектов и методов исследования. Автор характеризует использованные тест-микроорганизмы – *S. aureus* 209 P, *B. subtilis* ATCC 6633 (рекомендованные ГФ РФ), *E. coli* ATCC 25922, а также рекомбинантный штамм *E. coli* MG1655 с плазмидой pXen7-lux и природный морской изолят *P. leiognathi* Sh1. Представлено описание оборудования, включая биохемилюминометры и ВЭЖХ-системы, а также условия проведения экспериментов. Данная глава демонстрирует методическую грамотность автора и создает надежную экспериментальную базу для последующих глав.

Глава 3 посвящена сравнительному исследованию антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием как регламентированных ГФ тест-культур, так и биолюминесцентных штаммов. Автором установлены корреляционные зависимости между диаметрами зон задержки роста тест-микроорганизмов и концентрациями 17 антибиотиков, что позволило оценить применимость каждого штамма для целей фармацевтического анализа. Показано, что биолюминесцентные бактерии, в частности *P. leiognathi* Sh1, обладают сопоставимой или превосходящей чувствительностью по сравнению с классическими тест-объектами, что явилось экспериментальным обоснованием для перехода к разработке новой методики.

Глава 4 является основной в работе – в ней представлена разработка оригинальной методики определения антимикробной активности

антибиотиков по изменению интенсивности биолюминесценции *P. leiognathi* Sh1. Автором проведен тщательный подбор оптимальных условий культивирования (температурный режим, время экспозиции, плотность бактериальной суспензии), установлены диапазоны линейных зависимостей интенсивности свечения от концентраций исследуемых субстанций, а также определены пригодные растворители. Критически важным элементом главы является оценка валидационных характеристик методики – специфичности, линейности, прецизионности, правильности и др. параметров, что подтверждает ее метрологическую пригодность для целей стандартизации лекарственных средств.

Глава 5 посвящена апробации разработанной методики на антибактериальных субстанциях, не включенных в действующую фармакопейную статью ОФС.1.2.4.0010.18. Автором определена антимикробная активность восьми лекарственных средств – кларитромицина, меропенема тригидрата, хлорамфеникола, налидиксовой кислоты, левофлоксацина гемигидрата, ципрофлоксацина, фуразолидона и фурацилина – с выражением результатов в биолюминесцентном индексе. Особый интерес представляет расширение сферы применения разработанного подхода как экспресс-метода, что подтверждено патентами РФ на изобретения. Завершается глава обоснованием возможности включения разработанной методики в нормативную документацию.

Завершают диссертацию логически обоснованные выводы, которые полностью соответствуют поставленным задачам, заключение, список литературы и пять приложений.

По теме диссертации опубликовано 22 работы, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России; оформлено 2 патента на изобретения.

Данные диссертации используются в учебных процессах на кафедрах медицинской и фармацевтической химии, фармации, микробиологии, вирусологии и иммунологии, базисной и клинической фармакологии, а также

в Центральной научно-исследовательской лаборатории федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

При положительной оценке результатов диссертационной работы Османовой Селины Ягьяевны имеется ряд **замечаний и вопросов**:

1. В третьей главе вы проводите сравнение природного люминесцентного штамма *Photobacterium leiognathi* Sh1 с фармакопейными тест-культурами и делаете вывод, что он может рассматриваться как аналог *Bacillus subtilis* АТСС 6633 на основании статистического теста на эквивалентность. Однако *Bacillus subtilis* – это грамположительная спорообразующая палочка, тогда как *Photobacterium leiognathi* – грамотрицательная бактерия. Клеточные стенки этих микроорганизмов имеют принципиально разное строение, что определяет различия в проницаемости для антибактериальных препаратов и в механизмах резистентности. Не считаете ли вы, что установленная статистическая эквивалентность по диаметрам зон ингибирования является в данном случае случайным совпадением, а не отражением истинной биологической сопоставимости? Как вы можете обосновать правомерность переноса результатов, полученных на грамотрицательном люминесцентном штамме, на грамположительный фармакопейный тест-объект, и не приведет ли это к ошибочной оценке активности антибиотиков, мишенью которых является именно клеточная стенка грамположительных бактерий?

2. В разделе 4.1.2 вы указываете, что для культивирования *Photobacterium leiognathi* Sh1 используется среда Nutrient agar M001 с добавлением 3% хлорида натрия. Однако для биолюминесцентного анализа вы готовите бактериальную суспензию и проводите инкубацию с антибиотиками в 3% растворе хлорида натрия, без добавления питательных веществ. Не приведет ли инкубация в течение 18 часов в голодной среде, то есть в физиологическом растворе, к угнетению метаболизма бактерий и, как

следствие, к снижению их люминесценции, не связанному с действием антибиотика? Как вы отделяли эффект антибиотика от эффекта голодания и осмотического стресса?

3. В четвертой и пятой главах вы демонстрируете, что антибиотики разных классов, включая ингибиторы синтеза белка, клеточной стенки и нуклеиновых кислот, вызывают снижение биолюминесценции. Однако биолюминесценция – это метаболический процесс, зависящий от многих факторов. Не может ли наблюдаемое снижение свечения быть следствием не специфического антимикробного действия, а прямого токсического влияния на фермент люциферазу или на систему генерации энергии, например, на восстановленный никотинамидадениндинуклеотид? Проводили ли вы контрольные эксперименты с антибиотиками, инактивированными вне организма, например, гидролизованными бета-лактамазами, чтобы подтвердить, что сигнал обусловлен именно антимикробным эффектом, а не химическим взаимодействием с компонентами люминесцентной системы?

4. Вы убедительно показали, что при 37 градусах Цельсия ампициллин и цефотаксим подвергаются значительному гидролизу. Однако в стандартной методике диффузии в агар антибиотик диффундирует в толщу агара, где условия, такие как водородный показатель, ионная сила и наличие белков, могут отличаться от условий в водном растворе, который вы исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Не считаете ли вы, что экстраполяция данных, полученных для чистых растворов, на сложную гетерогенную систему «агар – антибиотик – микроорганизм» является не вполне корректной? Проводили ли вы хроматографический анализ самого агарового блока после инкубации, чтобы подтвердить, что деградация происходит именно в тех условиях и с той же скоростью?

5. В разделе 5.3 вы предлагаете сокращенную методику с 30-минутной инкубацией для оценки нестабильных антибиотиков. Однако для антибиотиков с бактериостатическим механизмом действия, например, тетрациклинов и макролидов, 30 минут может быть недостаточно для

проявления ингибирующего эффекта, так как требуется несколько циклов деления клеток. Не приведет ли такое сокращение времени к ложноотрицательным результатам для целых классов антибактериальных препаратов? Проводили ли вы сравнение результатов 30-минутной инкубации с классической 18-часовой для всего спектра исследуемых антибиотиков, чтобы подтвердить сопоставимость результатов?

6. В работе вы предлагаете проект общей фармакопейной статьи. Однако для внедрения в фармакопею необходимо не только показать преимущества метода, но и доказать его независимость от существующих. В чем заключается принципиальное преимущество вашего метода перед уже существующими автоматизированными системами для определения минимальной подавляющей концентрации, например, VITEK 2 или систем на основе турбидиметрии, которые также позволяют получать результаты в течение нескольких часов и обладают высокой степенью стандартизации? Является ли ваш метод более экономически эффективным или более чувствительным для конкретных классов антибиотиков, где существующие автоматизированные системы не справляются?

7. В работе встречаются технические опечатки и стилистические неточности.

Указанные замечания не являются принципиальными, а возникшие дискуссионные вопросы носят только уточняющий характер и не снижают ценности большой и актуальной работы.

6. Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы и соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к авторефератам диссертаций на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Объем и структура автореферата соразмерны основным разделам диссертации и включают все ключевые элементы:

введение с обоснованием актуальности, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию, положения, выносимые на защиту, апробацию результатов, а также заключительные выводы.

Содержание автореферата в полной мере передает основные результаты, полученные автором в ходе выполнения диссертационного исследования, в том числе: обоснование выбора объектов исследования, результаты сравнительного изучения антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар с использованием регламентированных ГФ тест-культур и биолюминесцентных штаммов, включая установленные корреляционные зависимости между диаметрами зон задержки роста и концентрациями исследуемых веществ, разработку оригинальной методики определения антимикробной активности методом биолюминесцентного анализа, оценку валидационных характеристик разработанной методики, а также результаты апробации методики на антибактериальных субстанциях, не включенных в действующую фармакопейную статью ОФС.1.2.4.0010.18.

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

Таким образом, диссертационная работа Османовой Селины Ягьяевны на тему: «Разработка методики оценки антимикробной активности антибиотиков с применением биолюминесцентного анализа», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи современной фармации по изучению антимикробной активности антибиотиков.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Османовой

Селины Ягьяевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), 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 управления и
экономики фармации, фармацевтической
технологии и фармакогнозии федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Оренбургский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
460000, Оренбургская область, г. Оренбург,
ул. Советская, д. 6
8(3532) 50-06-06,
anna.shmygareva@mail.ru
доктор фармацевтических наук (14.04.02 –
фармацевтическая химия, фармакогнозия),
профессор Шмыгарева Анна Анатольевна

02.11.2026

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
ПОДПИСИ ЗАВЕРЯЮ:
Начальник отдела кадров
Е.Н. Бердникова

С отзывом ознакомлена. 05.11.2026