

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

доктор медицинских наук

профессор



В. В. Бекезин

2019г.

Отзыв ведущей организации

о научно-практической ценности диссертации Степаненко Ирины Семеновны на тему «Производные замещенных бензаминдолов и пирролохинолонов – новый класс соединений с противомикробной активностью» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность выбранной темы

Диссертационная работа Степаненко И. С. посвящена решению одной из главных проблем современного здравоохранения во всем мире – развивающаяся резистентность микроорганизмов к противомикробным препаратам. Согласно данным ВОЗ, бактерии, являющиеся возбудителями распространённых инфекционных заболеваний, всё чаще вырабатывают резистентность к традиционно используемым в медицинской практике антимикробным препаратам. Более того, все чаще появляются мультирезистентные микроорганизмы, устойчивые к двум и более известным противомикробным препаратам. Особую опасность представляет развитие полирезистентности у нозокомиальных штаммов микроорганизмов, поскольку именно они являются одной из важнейших причин заболеваемости, смертности населения и увеличения экономических

затрат на лечение. Масштабное развитие множественной резистентности у нозокомиальных микроорганизмов диктует необходимость разработки и внедрения новых противомикробных препаратов, что является необходимым условием выбора адекватной стратегии для эффективной терапии, дезинфекции, антисептики и предотвращения распространения устойчивых штаммов микроорганизмов.

Вместе с тем, за последние несколько десятилетий процесс разработки и создания новых противомикробных препаратов резко замедлился. Современное здравоохранение во всём мире испытывает необходимость в создании новых эффективных противомикробных препаратов.

В этой связи актуальность темы диссертации И. С. Степаненко, теоретическая и практическая значимость сомнений не вызывают, как и цель исследования, в качестве которой определена разработка, получение нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практическое обоснование безопасного использования выявленной противомикробной активности индолиламидов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки

Работа выполнялась в соответствии с Паспортом научных направлений ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева» (Решение НТС, протокол №1 от 09.02.2018г.) и с научной тематикой «Исследование чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным средствам и поиск новых соединений с противомикробной активностью» кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева».

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Конкретные элементы новизны, определяющие научную и практическую значимость диссертации Степаненко И. С., составляют следующие положения:

1. Предложено и обосновано научное направление по получению и изучению нового поколения антимикробных и противогрибковых препаратов. При этом реализованы синтетические возможности использования в качестве исходных соединений, замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов, синтезирована серия индолиламидов и пирролохинолинов, доказана перспективность целенаправленного синтеза биологически активных соединений на основе ароматических аминов индольного ряда.
2. Полученные химические соединения, на основе замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов, способны оказывать противомикробное воздействие на прокариотические микроорганизмы.
3. Замещенные амиды и пирролохинолоны, полученные на основе 4-, 6-,7-аминоиндолов обладают высокой противомикробной активностью и широким спектром действия.
4. Наиболее активные амиды, полученные на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов являются практически нетоксичными соединениями при различных путях введения в условиях *in vivo*.
5. Исследуемые соединения в минимальных подавляющих концентрациях оказывают бактериостатическое действие.
6. Соединения с потенциальной противомикробной активностью, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов не оказывают токсического воздействия на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.
7. Синтетические производные 4-, 6-, 7-аминоиндолов демонстрируют дозозависимый SOS-индуцирующий эффект *in vitro*. Выявленная способность определяет один из механизмов биологического действия

исследуемых соединений на прокариотическую клетку – воздействие на ДНК.

8. Исследуемые соединения эффективно препятствуют распространению микроорганизмов в подлежащие ткани и генерализации инфекционного процесса и ускоряли заживление зараженных ран на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo*.

9. Противомикробная активность соединений, на основе замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов, зависит от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах.

Исследование Степаненко И. С. было посвящено разработке и получению нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практическому обоснованию безопасного использования выявленной противомикробной активности индолиламидов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

На химико-технологическом этапе исследования автором были разработаны методы получения и синтезированы 16 аминокиндолов и 32 производных аминокиндолов – индоламинов, енаминов и пиррохинолонов. С помощью компьютерной системы прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа, так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности произведен отбор 19 потенциально активных соединений.

Диссертантом выявлено, что отобранная серия индолиламидов и пирролохинолонов на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов способна оказывать противомикробное действие на тест-штаммы изученных условно-патогенных и некоторых патогенных прокариотических микроорганизмов и опытные штаммы условно-патогенных и некоторых

патогенных микроорганизмов, представителей семейств *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, что позволяет характеризовать ее как группу новых абиотических химических факторов.

Для выделения из представленного ряда производных замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов наиболее перспективных молекул автор остановился на двух ключевых параметрах: противомикробная эффективность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также острая токсичность при внутрибрюшинном, внутрижелудочном введении и на кожном нанесении. В результате исследования представленной группы соединений диссертант установил, что 6 соединений на основе замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов являются потенциальными противомикробными агентами – это циклические амиды 5D, 7D, HD, нециклический амид S3 и пирролохинолоны 39D, 4D. Автором были показаны преимущества исследуемых соединений по сравнению с традиционно применяемыми антимикробными препаратами на примере антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов.

Наряду с этим, при исследовании зависимости биологической активности индолиламидов, енаминокетонов, пирролохинолинов от их элементного состава и строения диссертантом доказано, что полученный и исследованный новый класс противомикробных соединений весьма перспективен, поскольку их основой являются структуры метаболитов, встречающиеся в некоторых живых организмах. Известно, что индольная и пирролохинолиновая системы являются структурными элементами молекул многих природных соединений. Было показано, что противомикробная активность соединений, на основе замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов, зависит от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах.

Для дальнейшего углубленного изучения спектра противомикробной активности, механизмов антимикробного действия, эффективности на

моделях экспериментальных инфекций в опытах *in vivo* с помощью функциональных возможностей метода бинарной логистической регрессии, на основании расчета показателей отношения шансов для коэффициента предикции активности (Pa), значения среднего межгруппового показателя ЛД₅₀ (среднее значение для самцов и самок мышей), активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов автором отобраны 4 наиболее перспективных соединения – циклические амиды 5D, 7D, HD и нециклический амид S3. Эти соединения сочетают высокую антимикробную активность и низкую токсичность, они довольно доступны, их можно синтезировать, по разработанным в диссертации методикам, с хорошими выходами и высокой степенью чистоты.

Диссертантом в процессе исследования разработан новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с антимикробной активностью. Новый способ определения типа противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) основан на вычислении коэффициента оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с противомикробными соединениями в жидкой питательной среде (Патент на изобретение РФ № 2687264 от 02.08.2018г.). Преимущества способа заключаются в быстром и качественном определении типа противомикробного действия биологически активных соединений, использовании небольшого количества питательной среды при достаточно коротком временном интервале, составляющем 24 ч.

Автором установлено, что исследуемые соединения в минимальных подавляющих концентрациях оказывают бактериостатическое действие и наблюдается устойчивая тенденция к задержке роста и размножения тест-штаммов микроорганизмов в их присутствии. Выявлено отсутствие токсического воздействия исследуемых соединений на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*. Определена дозозависимая SOS-индуцирующая активность исследуемых соединений *in vitro*, что определяет

один из механизмов их биологического действия на прокариотическую клетку – воздействие на ДНК.

Диссертантом было показано, что местное лечение исследуемыми соединениями, приводило к сокращению числа жизнеспособных микроорганизмов в ранах значительно раньше, чем можно было бы ожидать при естественном заживлении необработанных ран, что приводило к элиминации бактерий из инфицированной ткани. Исследуемые соединения эффективно препятствовали распространению микроорганизмов в подлежащие ткани и генерализации инфекционного процесса и значительно ускоряли заживление зараженных ран.

Таким образом, диссертантом на доклиническом этапе исследования разработаны методы получения и синтезирован новый класс синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и обосновано безопасное использование выявленной противомикробной активности индолиламидов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии, соответственно диссертация И. С. Степаненко содержит совокупность новых научных результатов, положений и выводов.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Результаты проведенного исследования, несомненно, имеют как теоретическую значимость для фармакологии, так и практическую значимость в области микробиологии и фармакологии противомикробных средств, медицинской химии и клинической фармакологии. Автором представлен экспериментальный фактический материал о закономерностях синтеза новых соединений, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, доказана перспективность поиска соединений с высокой противомикробной активностью среди замещенных индолиламидов и пирролохинолонов, в

процессе исследования разработан новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с антимикробной активностью, на основе скрининга получена и исследована новая серия синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладающих той или иной противомикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, полученные результаты являются основанием для дальнейшего исследования синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов с целью клинического применения изученных соединений в качестве противомикробных препаратов. Результаты настоящей работы значительно расширяют существующие представления о соединениях обладающих противомикробной активностью, как с точки зрения микробиологии прокариот, так и в аспекте фармакологии лекарственных средств.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы И. С. Степаненко, могут быть полезны для исследователей, занимающихся синтезом, разработкой, созданием лекарственных форм и выпуском противомикробных препаратов, например, ОАО «Биохимик» (г. Саранск); ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва) и т. п.

Результаты представленной работы внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс кафедры химии, технологии и методик обучения ФГБОУ ВО «МГПИ им. М. Е. Евсевьева», кафедр иммунологии, микробиологии и вирусологии и фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева». Результаты исследовательской работы включены в программу обучения ординаторов и аспирантов Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» и аспирантов ФГБОУ ВО «МГПИ им. М. Е. Евсевьева» в качестве лекционного и дополнительного учебно-методического материала.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается использованием для синтеза исследуемых соединений коммерчески доступных реагентов известных фирм (Sigma-Aldrich, Acros Organic и др.), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H), ультрафиолетовой спектроскопии (УФ), инфракрасной спектроскопии (ИК), масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), элементного анализа для доказательства строения, состава и индивидуальности соединений, полученных при выполнении химического эксперимента, достаточным объемом микробиологического материала, наличием документации к используемым тест-культурам микроорганизмов, использованием для окончательной идентификации и исследования чувствительности к антибиотикам исследуемых опытных штаммов автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK), достаточным объемом исследований с использованием сертифицированных животных, корректно проведенной обработкой данных с применением современных методов статистического анализа, соблюдением этических требований и проведением исследований в соответствии с международными стандартами. Методы, используемые в работе, соответствуют целям и задачам диссертационного исследования.

Для получения достоверных результатов в работе использовано достаточное количество тест-штаммов и клинических штаммов микроорганизмов. Благодаря использованию классических и современных аналитических методов получено множество статистически достоверных данных об антимикробной активности изучаемых соединений. Полученные данные наглядно представлены в диссертационной работе в виде таблиц, рисунков, графиков и микрофотографий. Статистическая обработка

полученных данных проведена адекватно и грамотно с использованием современных методов статистического анализа.

Исходя из вышеуказанного, научные положения, выдвигаемые диссертантом, выводы и заключения, сформулированные в результате работы, обоснованы и достоверны.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Сложность достижения поставленной в диссертации цели потребовала использования адекватного научного аппарата для решения сформулированных в исследовании задач и определила структуру изложения материала. В этой связи отметим, что при разработке теоретических аспектов рассматриваемой проблемы автором использованы, развиты и дополнены теоретико-методологические положения, содержащиеся в трудах отечественных и зарубежных ученых в области фармакологии противомикробных соединений.

Диссертация И. С. Степаненко имеет внутреннее единство и носит завершенный характер, поставленные цели соответствуют полученным результатам. Тема диссертации соответствует заявленной научной специальности. Диссертационная работа построена традиционно, представлена в виде рукописи, имеет следующую структуру: титульный лист, оглавление, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 9 глав собственных исследований, заключение, итоги выполнения диссертационной работы, выводы, перспективные направления дальнейшего развития темы диссертационного исследования, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа выполнена печатным способом на 429 страницах. Список литературы содержит 535 литературных источников: 174 – отечественных и 361 – зарубежный. Работа оформлена с использованием 109 таблиц, 29 рисунков и 25 схем.

Соискателем даны ссылки на авторов и источники, откуда он заимствовал материалы и указаны ссылки в отношении научных работ соискателя, выполненных им в соавторстве.

Соискатель грамотно и структурно-содержательно оформил выводы и показал результативность проведенного исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертационной работы, соответствует основным положениям и выводам, оформлен лаконично на 48 страницах машинописного текста.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликованы 46 научных работ, из которых 19 статьи – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций на соискание ученых степеней. Опубликованные труды отражают содержание диссертации, положения, выносимые на защиту, отражены в опубликованных работах.

Изложенное выше позволяет считать теоретические, методологические и практические результаты диссертации не вызывающими серьезных возражений. Вместе с тем, отмечая актуальность диссертационного исследования, его новизну и значимость для науки и практики, следует высказать следующие замечания и пожелания:

1. В представленной работе для наиболее активных соединений полезно было бы провести дополнительные исследования по изучению формирования к ним резистентности микроорганизмов, например, определить МИК и МБК этих соединений при многочисленном пассировании клеток.

2. В работе имеется ряд опечаток, грамматических ошибок и стилистических погрешностей.

Указанные пожелания и замечания не носят принципиального характера и не снижают научной и практической значимости выполненной автором работы.

Заключение

Таким образом, диссертация Степаненко Ирины Семеновны «Производные замещенных бензаминоиндолов и пирролохинолонов – новый класс соединений с противомикробной активностью», представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы по преодолению антибиотикорезистентности микроорганизмов и повышению эффективности противомикробной химиотерапии в результате поиска новых соединений с антимикробной активностью, имеющей значение для развития фармакологии и клинической фармакологии, в частности, и медицинских наук, в целом, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335, от 01.10.2018г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология.

Отзыв обсужден на заседании НИИ антимикробной химиотерапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

