

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева»
доктор технических наук, профессор
П.В. Сенин
« 12 » 2018г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования

«Национальный исследовательский

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева»

по диссертационной работе

«Производные замещенных бензаминоиндолов и пирролохинолонов – новый
класс соединений с противомикробной активностью»,

выполненной Степаненко Ириной Семеновной на кафедре иммунологии,
микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.
П. Огарева» Министерства науки и высшего образования РФ.

В 2000 г. Степаненко И. С. окончила медицинский факультет Мордовского
государственного университета им. Н. П. Огарева по специальности «Лечебное
дело». Диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
теме «Антиаритмическая активность некоторых L- и D-аминокислот и их
рацематов» защитила в июле 2002 года в диссертационном совете ГУП «ВНЦ БАН»
(г. Старая Купавна, Московская область). С сентября 2012 г. по настоящее время
доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «МГУ
им. Н. П. Огарева». Приказом Министерства образования и науки РФ от 15.09.2015г.
№ 971/нк-2 присвоено ученое звание доцента по специальности «Микробиология».

Научный консультант:

Блинова Екатерина Валерьевна – доктор медицинских наук (14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология), доцент, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

По результатам обсуждения диссертации принято следующее **заключение:**

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Тема диссертации посвящена актуальной проблеме – разработка и получение нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать губительное воздействие на проکاریотические микроорганизмы и научно-практическое обоснование безопасного использования выявленной противомикробной активности индолилами́дов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Предложено и обосновано научное направление по получению и изучению нового поколения противомикробных соединений анилидной группы. При этом реализованы синтетические возможности использования в качестве исходных соединений, замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, синтезирована серия, содержащая нециклические и циклические индолилами́ды и пирролохинолоны, доказана перспективность целенаправленного синтеза биологически активных соединений на основе ароматических аминов индольного ряда. В результате исследования реакций 4-амино-2-фенилиндола с β -кетозэфирами (этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты, этиловым эфиром трифторацетоуксусной кислоты) были получены нециклический амид (соединение с лабораторным шифром 6D), пирролохинолон (соединение с лабораторным шифром 17), дигидропирролохинолон (соединение с лабораторным шифром 5D). Реакции различно замещенных 5-

аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в термических условиях шли преимущественно с участием сложноэфирной группы кетоэфира. При этом образовывались соответствующие амиды нециклического строения (соединения с лабораторными шифрами 2D, 3D, 32D, 43D, 64D, 66D, 235D). Образование циклических амидов из 5-аминоиндолов не зафиксировано. Замыкание цикла с одновременной ароматизацией наблюдалось лишь для одного амида в трифторуксусной кислоте с получением пирролохинолона (соединение с лабораторным шифром 39D). Первичная реакция 6-аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в бензоле со следами соляной кислоты приводила к образованию соответствующих амидов, то есть превращение реализовывалось за счет этоксикарбонильной группы кетоэфира. При этом в зависимости от природы заместителя у пиррольного атома азота шло образование нециклических амидов (соединения с лабораторным шифром 243D, S3), циклического амида (соединение с лабораторным шифром 7D), пирролохинолонов (соединения с лабораторными шифрами ТФПХ, КПХ). При кипячении в бензоле с каталитическими количествами ледяной уксусной кислоты 7-амино-2,3-диметилиндо́л и трифторацетоуксусный эфир реагировали с образованием циклического амида (соединение с лабораторным шифром HD), в кислотных условиях (кипящая вода - трифторуксусная кислота) циклический амид (HD) с отщеплением воды ароматизовался в трифторметилпирролохинолон (лабораторный шифр 1D), под действием диметилсульфата трифторметилпиррохинолон (лабораторный шифр 1D) метилировался по пиридоновому и пиррольному атомам азота и при этом образовывался дважды метилированный трифторметилпирролохинолон (лабораторный шифр 4D).

Впервые определена способность замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов оказывать неблагоприятное воздействие на рост тест-штаммов прокариотических микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA), *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 1238 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма, *Pseudomonas aeruginosa* 453, *Escherichia coli* M-17, *Staphylococcus aureus* 906, *Enterococcus faecalis*

19433 ATCC, *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Klebsiella pneumoniae* 13883 ATCC, *Bacillus cereus* 96, *Mycobacterium tuberculosis*.

Впервые выявлена противомикробная активность замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов в результате исследования более 3000 штаммов опытных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, представителей семейств *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, являющихся возбудителями неспецифических и некоторых специфических инфекционных заболеваний человека *in vitro*.

Впервые проведен скрининг противомикробной активности замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и отобрана группа амидов, полученных на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов с наибольшей активностью.

Впервые изучена острая токсичность потенциальных противомикробных соединений при различных путях введения в условиях *in vivo* и определено, что наиболее активные амиды, полученные на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов являются практически нетоксичным соединениям.

Впервые изучен спектр и тип противомикробного действия соединений с потенциальной противомикробной активностью, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов. Синтетические производные 4-, 6-, 7-аминоиндолов продемонстрировали различный спектр противомикробного действия от узкого до широкого, включающего способность подавлять рост и размножение грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов. Впервые доказана способность исследуемых соединений оказывать в минимальных подавляющих концентрациях бактериостатическое действие и устойчивая тенденция к задержке роста и размножения тест-штаммов микроорганизмов в присутствии производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов.

Впервые выявлено отсутствие токсического воздействия соединений с потенциальной противомикробной активностью, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.

Впервые выявлена способность повреждения генетического материала клеток прокариот синтетическими производными 4-, 6-, 7-аминоиндолов *in vitro*. Таким образом, механизм биологического действия исследуемых соединений на прокариотическую клетку включает воздействие на ДНК.

Впервые подтверждена противомикробная активность замещенных амидов на основе 4-, 6-, 7-аминоиндолов в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo*. 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 ускоряли заживление зараженных ран.

Впервые установлены закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследованных индолиламидах и пирролохинолонах. Противомикробная активность, полученных и изученных производных индола и пирролохинолина, из анализа результатов проведенных исследований и литературных данных обусловлена боковой цепью молекул. Выраженная антибактериальная активность характерна для соединений, имеющих трифторметильную группу в амидной части молекулы. Отсутствие в молекуле фторсодержащего заместителя приводит к потере активности препарата против микроорганизмов. Так соединения 17, 6D не обладают в приемлемых концентрациях каким-либо заметным действием против исследуемых штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Наблюдается также тесная зависимость противомикробной активности от тонкой структуры препарата. Из литературных данных известно, что важными классами антимикробных препаратов являются спирты и амиды, т. е. соединения содержащие НО- или О=C-NH-группы. Этим требованиям отвечают, полученные и исследованные, циклические амиды HD, 5D, 7D, в молекулах которых имеются как закрепленная гидроксильная, так и амидная группы. Действительно эти соединения по сравнению с другими показывали наибольшую противомикробную активность.

Нециклические амиды, полученные на основе 5-аминоиндолов, либо узконаправлены, либо малоактивны в отношении изученных штаммов микроорганизмов. Активность нециклических амидов зависит от характера замещения в бензольном и пиррольном кольцах индольной системы, а также положения амидной группировки. Наличие или отсутствие метильных групп в индольном фрагменте амидов не вносят существенного изменения противомикробной активности. Метоксильная группа в положении 6 индолил-5-амида резко снижает противомикробную активность.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

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. Представлен экспериментальный фактический материал о закономерностях синтеза новых соединений, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Показана перспективность поиска соединений с высокой противомикробной активностью среди замещенных индолиламинов 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, содержащая 19 соединений, 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.

СВЯЗЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИИ С ПЛАНОМ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФГБОУ ВО «МГУ ИМ. Н. П. ОГАРЕВА»

Настоящая 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 ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева».

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н. П. Огарева» 23 октября 2015 (протокол №10).

ОБОСНОВАННОСТЬ И ДОСТОВЕРНОСТЬ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

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», 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. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

ЛИЧНОЕ УЧАСТИЕ СОИСКАТЕЛЯ В РАЗРАБОТКЕ ПРОБЛЕМЫ

Степаненко Ирина Семеновна лично выдвинула концепцию о направленном синтезе и изучение физиологического действия новых биологических активных соединений со строго определенной структурой, представляющих фармакологический интерес, как основе для поиска и расширения спектра абиотических факторов окружающей среды, неблагоприятно влияющих на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы и платформе для скрининга новых потенциальных противомикробных препаратов, создающей возможности их дальнейшего изучения и перспективы применения в медицинской практике и обосновала ее. Лично автором осуществлена разработка дизайна исследования. Автор непосредственно участвовала во всех этапах диссертационного исследования. Автор самостоятельно написала рукопись настоящей диссертации и автореферат, принимала основное участие в подготовке научных публикаций.

ПОЛНОТА ОПУБЛИКОВАНИЯ В ПЕЧАТИ

Основное содержание диссертационного исследования достаточно полно отражено в автореферате и в 46 научных публикациях соискателя, в том числе 19 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для опубликования результатов диссертаций на соискание ученых степеней и 8 включенных в международные системы цитирования и базы данных SCOPUS и Web of Science. По результатам исследования получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

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.

Результаты работы стали основой для выпуска ряда документов таких как, «Внебольничная пневмония: практические рекомендации по диагностике и лечению: Методические рекомендации» (Н. М. Селезнева, И. С. Степаненко, И. В. Акулина. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2005. – 51 с.), «Культуральные свойства клинически значимых микроорганизмов (пособие для врачей)» (И. С. Степаненко, Г. Н. Холодок, И. П. Кольцов. – Хабаровск, 2007. – 76 с. : ил.), Патент на изобретение «Противомикробное средство» №2556509 приоритет от 11.02.2014 (дата публикации 10.07.2015), «Культуральные свойства клинически значимых микроорганизмов: учебное пособие» (И. С. Степаненко, Г. Н. Холодок, И. П. Кольцов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – 76 с. : ил.), в ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности» поданы две заявки на изобретения («Способ получения *N*-(индолил)трифторацетамидов, обладающих противомикробным действием», регистрационный номер: 2018121537 и «Способ определения типа противомикробного действия соединений, обладающих антимикробной активностью», регистрационный номер: 2018128308) по которым по результатам проведения экспертизы по существу принято положительное решение.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ДОЛОЖЕНЫ И ОБСУЖДЕНЫ НА:

Международной молодежной научно-практической конференции (Ярославль, 2013), Международных научно-практических конференциях (Тамбов 2013, 2017), ежегодных Международных конгрессах МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2013; 2015), Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2014), ежегодных Всероссийских конгрессах по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2015; 2016; 2018), ежегодных научных конференциях «Огаревские чтения» ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» (Саранск, 2014; 2015; 2017).

Первичная документация проверена и соответствует материалам, включенным в диссертацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Степаненко И. С., выполненная при научном консультировании доктора медицинских наук, доцента Блиновой Е. В. является научно-квалификационным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно рассматривать как новое решение крупной научной проблемы – расширение спектра абиотических химических факторов окружающей среды, неблагоприятно влияющих на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, для создания нового класса синтетических лекарственных средств, создающего возможности для повышения эффективности противомикробной химиотерапии в медицинской практике и имеет важное научно-практическое значение как для микробиологии прокариот, так и для фармакологии лекарственных средств.

Диссертационная работа Степаненко Ирины Семеновны «Производные замещенных бензаминоиндолов и пирролохинолонов – новый класс соединений с противомикробной активностью» рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология.

Диссертация соответствует требованиям п.14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г. и не содержит заимствованного материала без ссылки на авторов.

Заключение принято на совместном заседании кафедр фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии и иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва».

Присутствовало на заседании:

21 человек, в том числе 11 человек, имеющих ученую степень кандидата медицинских наук и 4 человека, имеющих ученую степень доктора медицинских наук.

Результаты голосования:

За – 21 человек, против – нет, воздержавшихся – нет.

Протокол № 11 от 12 декабря 2018 года.

Председатель заседания:

заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии
Медицинского института
ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева»,
доктор медицинских наук, профессор

В. И. Инчина

Секретарь заседания:

доцент кафедры иммунологии,
микробиологии и вирусологии
Медицинского института
ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева»
кандидат медицинских наук

Ю. А. Костина

Подписи заверяю:



Подпись: Судов И. И.