



РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ
ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
тел.: (495) 982-50-84, факс (499) 253-14-91
ИНН 7703056867, КПП 770301001
E.mail: vgnki@fsvps.gov.ru
http://vgnki.ru

16 МАЙ 2022 № 1113/5.5
на № _____ от _____

Председателю
диссертационного совета
Д 24.1.249.02 при ФГБНУ
ФНЦ ВИЭВ
РАН, чл.-корр. РАН, доктору
ветеринарных наук,
профессору
А.В. Успенскому
117218, Москва, ул.
Б.Черёмушкинская, д. 28,
ВНИИП

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Варламовой Анастасии Ивановны на тему: «Биологическая активность, токсические свойства и особенности фармакокинетики и биотрансформации супрамолекулярного комплекса фенбендазола, полученного по механохимической технологии с адресной доставкой», представленную к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.17 - Паразитология, 4.2.1 – Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология, в совет по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 24.1.249.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Актуальность диссертации

Паразитарные болезни овец и крупного рогатого скота имеют достаточно широкое распространение. Гельминтозы причиняют огромный экономический ущерб вследствие значительного снижения роста и развития молодняка, а также снижения качества и количества продукции. Влияние гельминтов и продуктов их жизнедеятельности, вызывают глубокие деструктивные изменения в органах и тканях и оказывают непосредственное влияние на качество продуктов убоя животных, ухудшая качество продукции животного происхождения.

Не смотря на достаточно большое количество фармакологических средств терапии, гельминтозы занимают значительную часть патологии сельскохозяйственных животных. Одним из применяемых антигельминтных препаратов из класса бензимидазолкарбаматов является препарат фенбендазол, который обладает широким спектром антигельминтного действия. Поскольку фенбендазол имеет слабую биодоступность актуальными становятся исследования по усилению эффективности препарата путем повышения его растворимости методом механохимической технологии.

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

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате проведенной работы диссертантом разработан инновационный антигельминтный препарат – супрамолекулярный комплекс фенбендазола на основе механохимической технологии и наноразмерных систем доставки, обеспечивающих повышение в несколько раз эффективности и снижение токсичности.

Физико-химическими методами установлено повышение в 24 раза растворимости СМКФ, уменьшение размера частиц препарата и изменение структуры частиц. Исследования также показали значительное повышение его антигельминтной активности по сравнению с базовым препаратом – субстанцией фенбендазола. Повышение в 2,5-3,0 раза эффективности СМКФ установлено при нематодирозе и других стронгилятозах пищеварительного тракта, диктиокаулезе, трихоцефалезе и мониезиозе овец и молодняка крупного рогатого скота. Установлено, что СМКФ безопасен для организма животных, относится к IV опасности, не обладает раздражающим, кумулятивным, эмбриотоксическим, тератогенным и иммунотоксическим действием. Препарат в терапевтической и в 5 раз повышенной дозах не оказывает отрицательного влияния на клинические, гематологические и биохимические показатели овец и молодняка крупного рогатого скота. Биотрансформация фенбендазола в организме овец после введения СМКФ происходит более интенсивно и быстрее по сравнению с субстанцией препарата.

Научная новизна работы подтверждена 4 Патентами на изобретение: № 2558922 от 10 апреля 2015 г., № 2560516 от 20.08.2015 г., № 2588368 от 27.06.2016 г. и № 27090119 от 13.12.2019 г (прилож.1-4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный препарат – СМКФ, обладает повышенной в 2,5-3 раза антигельминтной эффективностью, что позволило снизить терапевтическую дозу до 2,0 мг/кг по ДВ.

Разработана Методика по применению СМКФ при гельминтозах овец и крупного рогатого скота, одобренная ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 4 от 2 сентября 2021 г.). По результатам испытания СМКФ на лабораторных моделях оформлены «Методические рекомендации по

испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели», одобренные на секции Методической комиссии ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, протокол № 3 от 29 мая 2019 г. Также предложены Методические рекомендации по определению фенбендазола и его метаболитов в молоке коров, одобренные на секции «Инвазионные болезни животных РАСХН, протокол № 2 от 21 сентября 2015 г., Методика количественного определения фенбендазола и его метаболитов в органах и тканях животных методом высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, одобренная научно-методической комиссией ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН 21 мая 2021 г. протокол № 2 и ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН 2 сентября 2021 г., протокол № 4.

Выводы и рекомендации обоснованы результатами экспериментальных исследований.

Основные положения, заключение и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, отвечают цели и задачам работы и логически вытекают из представленного фактического материала. Обоснованность и достоверность материалов исследований автора подтверждается большим объемом исследований, проведенных на современном методическом уровне и статистической обработкой полученных данных.

При выполнении работы были использованы теоретические и общепризнанные современные методы исследований и анализа, а также гельминтологические, клинические, гематологические, биохимические, токсикологические и статистические методы.

Материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях Ученого совета ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (2014-2021 гг.), Всероссийской конференции с Международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (г. Барнаул, 2014), VII научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации» (г. Иваново, 2014), XII научной конференции по паразитологии в Грузии (г. Тбилиси, 2014), Международной конференции «Актуальные проблемы развития ветеринарной науки» (г. Самара, 2014), Международной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии» (Москва, 2014), научной конференции по медицинской химии (Новосибирск, 2015), 25-th International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (Liverpool, 2015), V Международной конференции «Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий» (г. Горно-Алтайск, 2015), 12-th European Multicolloquium of Parasitology (Turku, Finland, 2016), IX Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации» (г. Иваново, 2016), XVI International Scientific conference with elements of school of young scientists (Moscow, 2016), International conference of World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (Kuala-Lumpur, Malaizia, 2017), International veterinary congress (Paris, 2017),

VII Всероссийской конференции с Международным участием (г. Барнаул, 2017), 7-th Conference of Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (Riga, 2017), Научно-практической конференции «Сельское хозяйство Горного Алтая» (г. Горно-Алтайск, 2017), 12-th International Symposium on the Chemistry of Natural compounds (Tashkent, 2017), VIII Международной Межвузовской конференции по клинической ветеринарии (Москва, 2018), III Всероссийской конференции с Международным участием «Горячие точки химии твердого тела» (г. Новосибирск, 2019), Международной научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (Москва, 2014-2020).

По материалам диссертации опубликовано 76 работ, в которых отражены основные положения и заключения по теме диссертации, в том числе 26 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и в изданиях системы Web of Science – 9 и Scopus – 3. Получено 4 патента на изобретения. В соавторстве опубликована монография.

Оценка содержания диссертации, её завершенности, достоверности полученных результатов исследований.

Диссертационная работа изложена на 260 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: общая характеристика работы, литературный обзор, собственные исследования, заключение, практические предложения, список использованной литературы, который включает 314 источников, в т. ч. 190 иностранных, и приложение. Иллюстрированный материал диссертации включает 33 рисунка и 74 таблицы.

В обзоре литературы проведен анализ сведений об эффективности фенбендазола и его лекарственных форм при гельминтозах животных

Так при анализе литературных данных диссертантом отмечается, что Фенбендазол в дозах 7,5-15,0 мг/кг эффективен практически против всех видов нематод крупного рогатого скота. Также автором указывается на то, что Фенбендазол в последние годы выпускается в различных лекарственных формах (гранулят, порошок, суспензия) под разными названиями и многими фирмами, в том числе в РФ и до сих пор является одним из эффективных и безопасных антигельминтиков.

В разделе, посвященном фармако-токсикологической характеристике фенбендазола проанализированы сведения о его токсичности. В частности отмечается, что фенбендазол из класса бензимидазолов хорошо переносится всеми видами домашних и диких животных. Антигельминтик в терапевтической дозе характеризуется отсутствием побочного влияния при дегельминтизации животных, в том числе молодых, больных и ослабленных. Фенбендазол не вызывал изменений у овец, получавших дозу в 1000 раз превышающую терапевтическую. Химиотерапевтический индекс выше 20. Не обладает эмбриотоксичностью, тератогенностью, мутагенностью.

При анализе литературных данных по изучению сроков выведения фенбендазола установлено, что через 14 суток фенбендазол и его метаболиты не обнаруживаются в органах и тканях животных. Фармакокинетические

исследования, проведенные с использованием флуорометрического метода на кроликах, овцах и крупном рогатом скоте, показали, что после введения терапевтической дозы фенбендазола 5,0 мг/кг максимальная концентрация препарата установлена у овец через 24 ч. Период полувыведения препарата составил 26 ч. Аналогичные результаты получены на крупном рогатом скоте.

В следующем разделе диссертантом собраны литературные данные по изучению средств адресной доставки лекарственных препаратов, способов и методов повышения их растворимости и эффективности. Так, в частности, отмечается, что одним из способов повышения эффективности лекарственных препаратов, в том числе, антигельминтиков, является повышение растворимости субстанций. Для улучшения параметров растворимости и абсорбции лекарственных веществ в настоящее время используют различные подходы, а именно: технологии микронизации, получения сокристаллов и твердых дисперсий, получение липидных наночастиц и коллоидных систем доставки лекарств, таких как микроэмульсии, самоэмульгирующие системы, липосомы и др. Твердые дисперсии полученные с использованием механохимической технологии, имеет такие преимущества, как отсутствие жидкой фазы, уменьшение побочных химических процессов, получение продукта в одну стадию и возможность получения твердой дисперсии нерастворимых веществ.

Проведенный автором анализ литературных данных характеризует состояние изученности проблемы и убеждает в актуальности и обоснованности цели, задач и основных положений диссертации, которые выносятся на защиту.

В разделе «Материалы и методы» диссертант перечисляет объекты исследования, приводит сведения об объеме выполненных работ и методиках научных исследований, сведениях о лабораторных животных, происхождении препаратов для проведения исследований. Представленные сведения свидетельствуют о том, что работа выполнена на обширном фактическом материале с применением современных паразитологических, гематологических, биохимических, токсикологических и фармакокинетических методик. Полученные автором результаты исследований подвергнуты статистической обработке современными методами, подтверждающими достоверность результатов и выводов.

Глава «Результаты собственных исследований» состоит из нескольких основных разделов и включает раздел по изучению физико-химических свойств супрамолекулярных комплексов фенбендазола, полученных по механохимической технологии, раздел по изучению токсичности разработанного препарата, раздел определения эффективности на лабораторной модели, при основных гельмонтозах овец и крупного рогатого скота, раздел по изучению фармакокинетики и остаточных количеств действующих веществ препарата, определению концентрации фенбендазола и его метаболитов в сыворотке крови и органах и тканях животных, и раздел по изучению эффективности СМКФ в производственных условиях при гельминтозах овец и крупного рогатого скота.

В разделе по изучению физико-химических свойств супрамолекулярных комплексов фенбендазола проведенными исследованиями установлено, что при воздействии механохимической технологии на смеси фенбендазола с различными вспомогательными веществами в несколько раз повышается растворимость комплексов, уменьшается величина частиц. Отработаны оптимальные режимы механохимического воздействия на смеси фенбендазола с различными веществами для адресной доставки.

В разделе, посвященному изучению токсических свойств супрамолекулярных комплексов фенбендазола, диссертантом были проведены опыты по изучению острой токсичности. В результате было установлено, что среднесмертельная токсичность для мышей при внутрижелудочном введении составила более 20000 мг/кг, что указывает на принадлежность к группе мало опасных веществ. Некоторые комбинации оказались более токсичны, чем базовый препарат, что обусловлено более высокой токсичностью самих средств доставки. При изучении кумулятивных свойств СМКФ с ПВП признаков интоксикации у крыс не отмечали, падежа зарегистрировано не было, что указывает на отсутствие кумулятивного действия. Также в опытах не было установлено местно-раздражающего действия препарата на кожу и слизистые оболочки.

При изучении субхронической токсичности СМКФ в различных дозах при пероральном введении в течение 7 суток не было отмечено существенного влияния на клиническое состояние и прирост массы тела животных. Гематологические и биохимические показатели крови не подвергались значительным изменениям. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии патологического воздействия СМКФ на организм крыс. Не удалось выявить иммунотоксического действия препарата в опытах на морских свинках, не смотря на проведение достаточно чувствительного теста. Также не было установлено эмбриотоксического и тератогенного действия СМКФ с ПВП.

В опытах по изучению активности и эффективности супрамолекулярных комплексов при гельминтозах на лабораторных моделях и спонтанно зараженных животных диссертантом получены данные, свидетельствующие о значительно более высокой эффективности СМКФ по сравнению с базовым препаратом. Так при изучении биологической активности СМКФ с различными компонентами на лабораторной модели *Trichinella spiralis* установлена 100%-ная активность СМКФ с ПВП в соотношении 1:10 в дозе 2,0 мг/кг по ДВ. Ожидаемо ниже оказалась цестодоцидная активность.

Диссертантом изучено влияние СМКФ в терапевтической, в 3 и 5 раз повышенных дозах на организм овец и крупного рогатого скота и установлено, что препарат не вызывает изменений в клинических показателях животных, а также гематологических и биохимических показателях крови, что свидетельствует об отсутствии его токсичности и хорошей переносимости.

В следующем разделе диссертантом приводятся исследования фармакокинетики фенбендазола и его основных метаболитов. В результате проведенных исследований установлено, что концентрация фенбендазола и его метаболитов была в 2,6–5 раза выше в сыворотке крови после введения СМКФ с максимумом через 33 ч. Скорость абсорбции и поступления фенбендазола в кровь после введения СМКФ была в 2,3 раза выше данных показателей базового фенбендазола. Также диссертантом получены данные о существенном увеличении концентрации в органах и тканях животных и сроках нахождения в организме фенбендазола и его метаболитов. Так максимальная концентрация фенбендазола и его метаболитов: сульфоксида и сульфона в органах и тканях животных после введения СМКФ в дозе 2 мг/кг по ДВ установлена на 3-и сутки. На 16-е сутки в печени обнаруживали только сульфоксид.

Автором установлены в тонком кишечнике высокие концентрации фенбендазола и его метаболитов через 2 суток после применения СМКФ, что подтверждает наличие адресной доставки фенбендазола к месту паразитирования нематод с помощью используемых вспомогательных веществ.

Последний раздел диссертационной работы диссертант посвятил изучению эффективности в производственных условиях. Комиссионные опыты, проведенные в производственных условиях, подтвердили высокую эффективность препарата. СМКФ в дозе 2 мг/кг по ДВ показал эффективность более 98% при нематодирозе и других стронгилятозах пищеварительного тракта овец и в дозе 3 мг/кг для молодняка крупного рогатого скота. При производственном испытании СМКФ подтверждена высокая его эффективность в дозах 2,0 и 3,0 мг/кг по ДВ против стронгилят пищеварительного тракта овец и молодняка крупного рогатого скота. СМКФ обладает в 2,5 раза большей антигельминтной активностью по сравнению с базовым препаратом – субстанцией фенбендазола, что позволило снизить терапевтическую дозу с 5,0 до 2,0 мг/кг по ДВ при стронгилятозах овец и с 7,5 до 3,0 мг/кг при стронгилятозах пищеварительного тракта молодняка крупного рогатого скота.

Расчетами показано, что применение препарата экономически целесообразно: приблизительный расчет дополнительной стоимости, полученной за счет увеличения количества производимой продукции и повышения ее качества в результате применения СМКФ составит 2650 руб. на 100 голов овец.

Диссертационная работа завершается обсуждением полученных результатов, в котором подводятся итоги проведенных исследований, дается анализ полученных результатов. Далее диссертантом делается заключение о проделанной работе, которое логично вытекает из результатов исследований и полностью отражает все основные разделы диссертации. В практических предложениях автором указаны рекомендации по использованию результатов исследований.

Список использованной литературы оформлен согласно требованиям ГОСТ и сопоставим с литературным обзором. Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы.

Оценивая диссертацию в целом положительно, следует отметить следующие замечания:

1. По тексту диссертации имеются единичные опечатки компьютерного набора (стр. 16, 28, 34), неудачные выражения (стр. 149 «для количественного определения его количества»), неточности (стр. 72 «гематологические показатели крыс» в разделе изучения крови овец).

2. На основании полученных результатов в опытах (модельных и производственных) по изучению эффективности супрамолекулярных комплексов при гельминтозах овец диссертантом рекомендуется использовать в качестве терапевтической дозу 2 мг/кг (по ДВ). При применении данной дозировки, в отличие от дозы 3 мг/кг, не было достигнуто 100% эффективности по снижению количества выделяемых яиц, а терапевтическая эффективность (полное освобождение животных от гельминтов) находилась на уровне 80-90%, что на наш взгляд явно недостаточно.

3. При сравнении эффективности фенбендазола субстанции и его супрамолекулярного комплекса со вспомогательными веществами наглядно показаны преимущества последнего, однако в связи с тем, что субстанция применяется только для производства препаратов было бы интересным сравнить эффективность СМКФ с известной препаративной формой фенбендазола, например, Панакуром. Возможно использование формы гранулята повышает эффективность фенбендазола.

4. В обсуждении диссертантом не объясняется ухудшение растворимости супрамолекулярных комплексов при увеличении времени экспозиции механохимического воздействия.

5. В приложении на наш взгляд патенты № 2560516 № 2588368 не вполне соответствуют тематике диссертационной работы.

Указанные замечания не носят принципиального характера, не снижают общей научной и практической ценности работы и её высокой оценки.

Заключение. Диссертация Варламовой Анастасии Ивановны на тему: «Биологическая активность, токсические свойства и особенности фармакокинетики и биотрансформации супрамолекулярного комплекса фенбендазола, полученного по механохимической технологии с адресной доставкой», является завершённым, научно-квалификационным самостоятельно выполненным научным исследованием, в котором содержится решение актуальной задачи по разработке комплексного препарата широкого спектра действия, имеющая важное теоретическое и практическое значение. Диссертация по своей актуальности, научной и практической значимости отвечает требованиям «Положения о порядке

присуждения ученых степеней» (Постановление правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), ВАК Министерства образования и науки РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор Варламова А.И. заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.17 - Паразитология, 4.2.1 – Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология

Официальный оппонент, гр-н РФ,
заведующий лабораторией контроля качества
лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»*

доктор биологических наук
06.02.03 (биологические науки)



Бондаренко Владимир Олегович

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
тел./факс (499) 253-14-91 E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных при работе диссертационного совета Д 24.1.249.02 по диссертационной работе Варламовой А.И.

Подпись Бондаренко В.О.
удостоверяю
Учёный секретарь ФГБУ «ВГНКИ»
доктор биологических наук,
профессор



Букова Н.К.