

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Варламовой Анастасии Ивановны «Биологическая активность, токсические свойства и особенности фармакокинетики и биотрансформации супрамолекулярного комплекса фенбендазола, полученного по механохимической технологии с адресной доставкой», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.17. Паразитология и 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология в диссертационный совет Д 24.1.249.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (Москва, ЦФО)

Актуальность проблемы. Применяемые в ветеринарной практике антигельминтные препараты, в том числе бензимидазол-карбаматы, высокоэффективны, обладают широким спектром действия против трематод, цестод и нематод. Их рациональное применение, чередование с другими паразитицидами позволяет надежно обеспечивать эпизоотическое благополучие по гельминтозам в животноводстве Российской Федерации.

Одним из наиболее востребованных и часто используемых лекарственных препаратов из класса бензимидазол-карбаматов является фенбендазол. Механизм действия вышеуказанной группы антигельминтиков заключается в повреждении микротубулярных клеточных структур гельминтов и, как следствие, в нарушении усвоения глюкозы, энергетического потенциала.

Фенбендазол эффективен в невысокой дозе (10-20 мг/кг) против нематод, а на трематод и цестод действует губительно в повышенной дозировке (100-150 мг/кг); относится к IV классу безопасности препаратов с низкой проницаемостью и растворимостью.

Для увеличения растворимости и биодоступности, а, следовательно, повышения эффективности препарата требуется выполнить комплекс технологических операций, основанных на использовании физико-химических методов. Ряд зарубежных и отечественных ученых, исследователей в результате многочисленных экспериментов установили возможность повышения эффективности лекарственных форм фенбендазола, благодаря уменьшению размеров частиц и изменению кристаллической решетки вещества. Перспективным оказалось также получение твердых дисперсных смесей с полимерами. Следует учитывать, что наряду с улучшением биодоступности, внутриклеточной проницаемости, снижается побочное, негативное действие лекарственных препаратов.

Эффект получения водорастворимых солей бензимидазол-карбаматов, а также их комплексов с полисахаридами позволит в будущем производить и инъекционные формы антигельминтных препаратов этого класса (никлозамид, альбендазол, триклабендазола).

В перспективе лекарственные формы, полученные по вышеуказанным технологиям (Drug Delivery System), будут выпускаться всё в большем объёме.

Цель исследований заключалась в изучении антигельминтных, токсических свойств, особенностей фармакокинетики и биотрансформации супрамолекулярного комплекса фенбендазола (СМКФ), полученного по механохимической технологии с использованием адресной доставки.

Для достижения цели А.И. Варламовой грамотно сформулированы и реализованы задачи (8), в том числе: изучение физико-химических свойств СМКФ, полученного с помощью механохимической технологии, токсических свойств, биологической активности с различными компонентами в качестве средств адресной доставки на лабораторных моделях, эффективности при основных гельминтозах овец и молодняка крупного рогатого скота и влияния на их физиологические показатели, фармакокинетики и биотрансформации фенбендазола в организме овец.

Кроме того, автором диссертации запланированы и проведены комиссионные и производственные испытания СМКФ при смешанных инвазиях овец и молодняка крупного рогатого скота.

Новизна и достоверность результатов диссертации, основных положений, заключения и предложений для практики.

Разработка инновационного антигельминтного препарата – СМКФ осуществлялась на основе механохимической технологии и наноразмерных систем доставки, обеспечивающих повышение в несколько раз эффективности и снижение токсичности. Получение препарата происходит в одну стадию путем твердофазного процесса механохимической обработки фенбендазола и водорастворимых полимеров или других вспомогательных компонентов. В результате субстанция препарата равномерно распределяется в порах и на поверхности носителя, что существенно изменяет свойства препарата – повышает растворимость, проницаемость и эффективность. При этом получение СМКФ происходит в одну стадию без участия жидкой фазы, при отсутствии сушки материалов и отходов производства, что позволяет уменьшить расход субстанции, снизить объемы его импорта и добиться более эффективного и безопасного лечения животных при нематодозах. Эта технология имеет ряд преимуществ перед известными методами – полное исключение из процесса растворителей, одностадийность, экологическая безопасность, возможность масштабирования и гибкость технологии.

Физико-химическими методами установлено повышение в 24 раза растворимости СМКФ, уменьшение размера частиц препарата и изменение структуры частиц.

Предварительные испытания СМКФ с поливинилпирролидоном на лабораторной модели *Trichinella spiralis* 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 желудочно-кишечного тракта, диктиокаулезе, трихоцефалезе и мониезиозе овец и молодняка крупного рогатого скота.

СМКФ безопасен для организма животных, 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. Фенбендазол и его метаболиты: фенбендазола сульфон и фенбендазола сульфоксид после введения СМКФ обнаруживают в органах и тканях овец в более высокой концентрации по сравнению с базовым препаратом – субстанцией фенбендазола.

Научная новизна работы подтверждена четырьмя Патентами на изобретение.

Методом механохимической технологии с использованием в качестве адресной доставки поливинилпирролидона разработан супрамолекулярный комплекс фенбендазола. Установлена терапевтическая доза препарата при нематодозах овец и крупного рогатого скота, равная соответственно 2 и 3 мг/кг по ДВ. На основании проведенных исследований по оценке фармако-токсикологических свойств супрамолекулярного комплекса фенбендазола разработана «Методика по применению супрамолекулярного комплекса фенбендазола при гельминтозах овец и крупного рогатого скота» и «Методические положения по испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе», одобренные методической комиссией «Инвазионные болезни животных» РАН. Создана и широко апробирована «Методика определения фенбендазола и его метаболитов в молоке коров, а также в органах и тканях животных методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием», одобренная на заседании Методической комиссии «Инвазионные болезни животных» РАСХН, научно-методической комиссией ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и Ученым советом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Результаты исследований обработаны статистически с использованием прикладных программ «Microsoft Excel», «Биостат» с определением средних величин и их ошибки, уровня достоверности полученных результатов, на основании которых сформулированы выводы. Тема диссертации, научное направление, методические материалы и результаты исследований доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (2014-2021 гг.), на Всероссийских и международных конференциях.

Ценность работы для науки и практики. Доказана возможность управления солубилизационным процессом и биологической активностью супрамолекулярных комплексов при использовании различных полимеров и других компонентов для адресной доставки препаратов за счет процесса комплексообразования с полимерами при твердофазной механохимической обработке в измельчителях-активаторах. Повышение растворимости и фармакологической эффективности достигается тем, что в процессе обработки молекулы действующего вещества распределяются в порах и на поверхности

частиц/макромолекул носителей. При этом обеспечивается улучшенная всасываемость препарата в желудочно-кишечном тракте при пероральном введении за счет ускоренного высвобождения действующего вещества и транспортировки его через биологические мембраны.

Полученные результаты открывают перспективу ускоренного создания широкого круга лекарственных средств, обладающих повышенной эффективностью. Разработанный препарат (СМКФ) обладает повышенной в 2,5-3 раза антигельминтной эффективностью, что позволяет снизить терапевтическую дозу до 2,0 мг/кг по ДВ.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы изложены в центральных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций по диссертациям, в изданиях, включенных в международные базы цитирования, а также в региональных журналах, трудах научно-исследовательских институтов, вузов и в материалах международных конференций.

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, 9 в изданиях системы Web of Science и 3 в Scopus. Получено четыре патента на изобретения. В соавторстве опубликована монография.

Диссертационная работа А.И. Варламовой является результатом самостоятельных исследований, выполненных с 2014 по 2022 гг. в лаборатории экспериментальной терапии, в виварии и Подольском отделе ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и в хозяйствах Московской, Самарской и Нижегородской областей. Консультативная помощь при выполнении диссертации осуществлялась научным консультантом, доктором ветеринарных наук, профессором РАН М.В. Арисовым.

Оценка содержания диссертации и степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа изложена на 260 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: общая характеристика работы, литературный обзор, собственные исследования, обсуждение, заключение, практические предложения, список использованной литературы, включающий 314 источников, в т.ч. 190 иностранных. Иллюстративный материал диссертации включает 33 рисунка, в том числе микрофотографии по гистопатоморфологии, и 74 таблицы.

В приложении приведены документы, подтверждающие результаты исследований и их внедрение в производство.

В главе «Собственные исследования» раздел «Материалы и методы исследований» включает подробное описание научно-производственных экспериментов (31). Всего выполнено 960 физико-химических, 588 общих клинических, 80 гематологических, 80 биохимических, 2262 гельминтологических исследований и проведено гистологическое изучение 280 образцов внутренних органов и плодов крыс.

В разделе «Результаты исследований» основные материалы посвящены изучению и реализации следующих аспектов: 1. повышение растворимости и

эффективности фенбендазола при создании препарата на основе механохимической технологии с использованием для адресной доставки поливинилпирролидона, образующего в воде супрамолекулярные комплексы; 2. получение препарата в одну стадию твердофазного процесса механохимической обработки с применением вспомогательных компонентов (ПВП, АГ, ЭС) в различных соотношениях в металлическом барабане мельницы LE-101; 3. физико-химические исследования (рентгенофазовый анализ, сканирующая электронная микроскопия, анализ растворимости методом ВЭЖХ, гранулометрический анализ), на основании которых доказано образование супрамолекулярного комплекса фенбендазола, снижение кристалличности субстанции, повышение растворимости, уменьшение размеров частиц, полидисперсность и частичное формирование агрегатов неправильной формы; 4. биологическая активность СМКФ с различными компонентами на лабораторных моделях *Trichinella spiralis* (100 %), *Hymenolepis nana* (85 %), что значительно превышает таковой показатель базового фенбендазола; 5. острая токсичность препарата с разными компонентами характеризуется наиболее выраженными токсичными свойствами СМКФ с НДОСС и с АГ Алтайского производства; 6. кумулятивные свойства новой формы препарата с ПВП в дозе 1/10 от ЛД50 в течение 28 суток не выражены, признаки интоксикации у крыс не отмечены; 7. субхроническая токсичность СМКФ в дозах 4000 мг/кг, 2000 мг/кг и 1000 мг/кг при пероральном введении крысам в течение семи суток не зарегистрирована (гематологические и биохимические показатели соответствуют физиологическим); 8. иммуно-, эмбриотоксическое и тератогенное действия отсутствуют; 9. активность СМКФ с АГ и СМКФ с ПВП при гельминтозах молодняка овец в 2-3 раза выше таковой базовой субстанции фенбендазола; 10. СМКФ с ПВП в дозе 2,0 мг/кг по ДВ показывает 99,7–100 % эффективность против половозрелых особей, личинок стронгилят ж.к.т. и обладает овоцидным действием; 11. СМКФ в терапевтической, в 3 и 5 раз повышенных дозах не оказывает негативного и побочного действия на организм овец и крупного рогатого скота (химиотерапевтический индекс препарата превышает 5); 12. оптимальные показатели фармакокинетики фенбендазола и его метаболитов после введения животным СМКФ, по сравнению с базовой субстанцией (скорость абсорбции и поступления препарата в кровь в 2,3 раза выше данных показателей базового препарата).

Высокая эффективность СМКФ с ПВП подтверждена результатами комиссионных испытаний при нематодозах желудочно-кишечного тракта молодняка овец и крупного рогатого скота в дозе 2 мг/кг по ДВ (ЭЭ=98 %).

В главе «Заключение» представлены краткие резюме по отдельным разделам диссертации и выводы, основанные на результатах исследований автора.

На основании изучения содержания диссертации, включая такие разделы, как «Материалы и методы исследований», «Результаты исследований» с обширным конкретным информативным иллюстративным материалом, «Заключение», «Практические предложения» можно утверждать, что научные положения, выводы и рекомендации обоснованы, достоверны и содержат

принципиальную новизну. Достоверность результатов диссертации подтверждается использованием современных эффективных клинических, лабораторных биохимических, физико-химических методов, сертифицированного оборудования, компьютерных программ обработки и анализа, большим объемом исследований, применением биостатистики, а также патентами и публикацией полученных данных в рецензируемых журналах.

Замечания. По существу научных положений, выводов диссертации, методологических подходов и по используемым методам при выполнении работы замечаний нет.

Автором диссертации представлен очень большой объем данных по валидации методики количественного определения фенбендазола и его метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.

В отечественной и зарубежной научной литературе имеется небольшое количество работ по получению и парентеральному применению при гельминтозах растворимых инъекционных форм бензимидазол-карбаматов (никлозамид и др.)? По Вашему мнению, насколько перспективны, эффективны вышеуказанные лекарственные формы препаратов при их использовании в животноводстве?

Липосомальные варианты супрамолекулярных форм бензимидазол-карбаматов при их внутримышечном назначении показывают высокую эффективность против половозрелых и личиночных стадий нематод, но не обладают имагоцидным действием на трематод и цестод. По-видимому, следовало бы в главе «ОБСУЖДЕНИЕ» представить анализ потенциально перспективных лекарственных форм СМК фенбендазола и других бензимидазол-карбаматов в зависимости от принадлежности возбудителей гельминтозов к классам Trematoda, Cestoda, Nematoda, от их стадий развития и локализации в тканях, органах животных, а также от степени биодоступности.

При подробном ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы. Чем обусловлено значительное повышение активности супрамолекулярного комплекса фенбендазола (СМКФ) против нематод? Какова эффективность СМКФ против личиночных стадий нематод (стронгилят желудочно-кишечного тракта, диктиокаулид, протостронгилид и стронгилоидесов)? Каковы перспективы применения разработанного Вами препарата СМКФ в животноводстве Российской Федерации?

Текст диссертации и автореферата тщательно выверен. Орфографические ошибки и стилистические погрешности не обнаружены. Ряд абзацев несколько перегружен смысловой (научно-методической) нагрузкой, но это не снижает понимания и скорости восприятия материала. В целом, диссертация легко читается и оставляет благоприятное впечатление не только как научный, но и литературный труд.

Заключение. Диссертация А.И. Варламовой на соискание ученой степени доктора биологических наук является завершенной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой. Полученные результаты, основные положения, выводы и практические рекомендации подтверждены

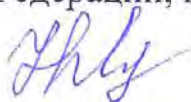
многочисленными исследованиями, обоснованы, аргументированы и достоверны.

Основные результаты диссертации статистически обработаны с помощью современных компьютерных программ и широко опубликованы. Научные исследования, выполненные диссертантом, представляют большой интерес для фундаментальной и прикладной биологической, ветеринарной науки.

В автореферате отражены основные результаты исследований, представленные в диссертации.

На основании вышеизложенного актуальность темы, объем выполненных исследований, новизна, теоретическое и практическое значение работы соответствуют диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

Диссертационная работа «Биологическая активность, токсические свойства и особенности фармакокинетики и биотрансформации супрамолекулярного комплекса фенбендазола, полученного по механохимической технологии с адресной доставкой», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.17. Паразитология и 4.2.1. и Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология, соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Российской Федерации к докторским диссертациям (Положение «О порядке присуждения ученых степеней», принятое постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 с последующим редактированием от 11.09.2021 г.), а ее автор А.И. Варламова заслуживает присуждения вышеуказанной ученой степени.

Доктор биологических наук, профессор,
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, профессор
кафедры эпидемиологии  Михаил Дмитриевич Новак

Почтовый адрес, телефон, электронная почта: 390026, г. Рязань,
ул. Высоковольтная, д. 9, телефон: +7-4912-97-18-01,
e-mail: rzgmu@rzgmu.ru, <https://rzgmu.ru>.

Подпись профессора М.Д. Новака заверяю:

Проректор по научной работе
и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
доктор медицинский наук, профессор



И.А. Сучков

24 мая 2022 года

